

REGINA ELIZABETE FERREIRA DLUGOKENSKI

EMPREGO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS  
DE *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953  
DANIFICADOS PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Área Concentração: Saúde Animal e Humana. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. João Carlos Minozzo

Co-orientadores:

Dr. Carlos Ricardo Soccol

Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski

2008  
CURITIBA

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por apresentar sempre oportunidades de crescimento.

Meus agradecimentos ao Governo do Estado do Paraná pela oportunidade oferecida aos servidores em aprimorarem seus conhecimentos através do convênio firmado entre as Secretarias Estaduais de Saúde (SESA), Ciência e Tecnologia (SETI) e a Universidade Federal do Paraná para o desenvolvimento de um mestrado profissionalizante na área de Processos Biotecnológicos.

Agradeço à Secretaria de Estado da Saúde pela sensibilização quanto à necessidade do desenvolvimento tecnológico em nosso estado.

Ao Fundo Paraná-SETI pelo apoio financeiro através de convênio firmado.

Ao meu orientador Dr. João Carlos Minozzo, pelas orientações realizadas e principalmente pela grande amizade.

Aos meus co-orientadores Dr. Carlos Ricardo Soccol e Dra Adenise Lorenci Woiciechowski pelas orientações realizadas.

Ao Sr. Rubens Luis Gusso, Diretor Geral do CPPI pelo grande empenho para a concretização deste mestrado e o apoio recebido durante o árduo percurso percorrido.

À Maria Inês Pizzol, chefe da Divisão de Produção do CPPI pela grande amizade, dedicação e apoio nas maiores dificuldades.

Com carinho especial, ao meu marido Eugênio, que soube primar pela paciência compreendendo a necessidade de minha ausência, confortando-me nos momentos difíceis.

Às minhas amadas filhas Rafaela e Camila por encaminharem tão bem suas vidas, serenando meu coração, permitindo uma grande dedicação ao desenvolvimento desta dissertação.

Um agradecimento especial à Camila pela enorme tranquilidade com que sempre me ouviu e pelas ponderações colocadas.

Agradeço à minha mãe, dona Regina, pelo exemplo de vida que nos fortalece no enfrentamento das diversidades.

À minha sogra Filomena e a minha cunhada Márcia, pela infra-estrutura organizada para o atendimento da minha família nos períodos de minha ausência.

Um agradecimento especial à minha grande amiga Sandra, pela sua dedicação e paciência, que com seu permanente otimismo me incentivou sempre a seguir em frente.

A Neide e Dirce pelas análises físico-químicas realizadas.

Ao meu orientador Dr. João Carlos Minozzo, pela dedicação e orientações realizadas.

A Júlia no auxílio para a realização de algumas termorresistências.

Agradeço especialmente às funcionárias do CPPI, Elza, Neuza e Sonilda pela grande dedicação no preparo dos materiais utilizados nos experimentos.

Aos estagiários Cristiane, Régis, Belquis, Wagner e Kátia, pelo auxílio prestado durante os ensaios.

Agradeço também às funcionárias Eva, Elizete e Shirley que apesar de não fazerem parte do quadro de funcionários da seção de insumos, sempre estiveram prontas para auxiliar nos momentos necessários.

À Susan Karp, pela delicadeza, paciência e empenho na determinação de algumas análises na UFPR.

À professora Adenise Lorenci Woiciechowski e Mitiyo pelas horas dedicadas na realização de alguns ensaios.

Aos professores Dr. José Hermenio C. Lima Filho, Msc. Luiz Alberto Junior Letti, Dr. Júlio Carvalho, Dra Vanete Thomaz-Soccol, Dra. Luciana P.S. Vandenberghe e Dra. Adriane B.P. Medeiros pelas orientações e ensinamentos recebidos.

À Michelle pela gentileza com que sempre se dispôs na elucidação de dúvidas.

## RESUMO

O uso de esporos termorresistentes como indicadores biológicos da efetividade dos processos de esterilização é fundamental para a segurança dos usuários dos serviços de saúde. Para tanto é necessário que se confirme a destruição ou não dos esporos após o término do ciclo de esterilização. Indicadores biológicos de segunda geração (auto-contidos) consistem de uma suspensão padronizada de esporos em um meio de cultivo capaz de proporcionar condições para a germinação e multiplicação dos esporos sobreviventes ao processo de esterilização. Geralmente meios de cultura sintéticos e quimicamente definidos são utilizados como meio de revelação. Este trabalho objetivou substituir os meios tradicionalmente utilizados, por vinhaça de soja que é um resíduo agroindustrial proveniente do processamento do melaço da soja para obtenção de álcool. Esporos padronizados e termorresistentes do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 foram utilizados para avaliar a capacidade germinativa do meio após exposição ao calor úmido sob pressão (autoclavação). A metodologia desenvolvida foi a recomendada pela Farmacopéia Americana em sua 29ª edição. O indicador biológico – Esteriteste (produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos) foi utilizado como padrão, cujo principal componente na formulação do meio germinativo é o caldo de soja tripticaseína (TSB), acrescido de amido solúvel (0,1g%), cloreto de cálcio (0,0018g%) e púrpura de bromocresol (0,001g%). Substituiu-se a matéria prima sintética importada por vinhaça de soja, nas diluições de 1:25, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 e 1:100, mantendo-se os demais elementos. Os melhores resultados foram verificados a partir da diluição 1:60 até 1:90, obtendo-se valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  entre 2,4 e 2,9 minutos. A adição de 0,8g% de extrato de leveduras na diluição de 1:70 elevou o valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  para 3,23 minutos. Em todos os resultados foram obtidos valores iguais ou acima do controle. As análises revelaram que a vinhaça de soja tem grande potencial para ser utilizada como meio para a recuperação de esporos danificados pelo calor em indicadores biológicos para esterilizações em autoclaves. O aproveitamento de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos agrega a minimização do impacto ambiental causado pelos efluentes, com a diminuição do custo de produção dos produtos gerados.

Palavras-chave: *Geobacillus stearothermophilus*. Esporos. Esterilização. Indicador biológico. Vinhaça de soja. Germinação.

## ABSTRACT

The use of thermoresistant spores as biological indicators of the effectiveness of sterilization processes is essential for the safety of the health service user. In order to achieve that, it proves necessary to confirm the destruction – or not – of the spores after the sterilization cycle is finished. Second-generation (self-contained) biological indicators consist of a standardized suspension of spores in a cultivating medium capable of providing the necessary conditions for germinating and multiplying those spores that survived the sterilization process. Usually, synthetic and chemically defined culture media are used as developing medium. The present work aimed at replacing the traditionally used media by soybean vinasse, which is an agro-industrial residue resulting from processing soybean molasses to obtain alcohol. Standardized and thermoresistant spores of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 were used for evaluating the germinative capacity of the medium after it had been exposed to moist heat (autoclavation). The methodology developed was the one recommended by the American Pharmacopoeia in its 29<sup>th</sup> edition. The biological indicator – *Esteriteste* –, produced by the Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos –CPPI, was used as standard, the main component of which, in the formulation of the germinative medium, is the tripticasein soy broth (TSB), to which soluble starch (0.1g%),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.0018 g%), and Bromocresol purple (0.001g%) were added. The synthetic imported raw-material was replaced by soybean vinasse, in dilutions (V/V) of 1:25, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, and 1:100, maintaining the other elements. The best results were observed from dilution 1:60 to 1:90, resulting in values of  $D_{121^\circ\text{C}}$  between 2.4 and 2.9 minutes. The addition of 0.8g% of yeast extract into the 1:70 dilution increased the value of  $D_{121^\circ\text{C}}$  to 3.23 minutes. In all results, values equal to or above control were obtained. The analyses revealed that soybean vinasse has a great potential to be used as a medium for recovering spores damaged by heat in biological indicators for sterilization in autoclaves. The use of agroindustrial waste in biotechnological processes aggregates the minimization of environmental impact caused by effluents and a decrease in production costs of the generated products.

**Keywords:** *Geobacillus stearothermophilus*. Spores. Sterilization. Biological Indicator. Soybean vinasse. Germination.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 - A) IB DE PRIMEIRA GERAÇÃO (FRASCOS COM O MEIO DE CULTURA ENVELOPES CONTENDO TIRAS DE PAPEL IMPREGNADAS COM ESPOROS; B) O PRODUTOR OFERECE SOMENTE AS TIRAS DE PAPEL IMPREGNADAS COM OS ESPOROS ..... | 28 |
| FIGURA 2 - A) IB AUTO-CONTIDO ATTEST 3M); B) IB AUTOCONTIDO BIOTECH; C) IB AUTOCONTIDO ESTERITESTE-CPPI .....   | 29 |
| FIGURA 3 - TRANSFERÊNCIA DE CALOR ATRAVÉS DO FRASCO DE VIDRO DO IB AUTOCONTIDO .....  | 30 |
| FIGURA 4 - INCUBADORA PARA IB DE TERCEIRA GERAÇÃO .....   | 30 |
| FIGURA 5 - ESQUEMA DO USO E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE BIOINDICADORES AUTOCONTIDOS PARA CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO .....  | 32 |
| FIGURA 6 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA COLORIZADA DE UM BACILO COM UM ENDOSPORO AINDA NO INTERIOR DA CÉLULA .....  | 40 |
| FIGURA 7 - ESQUEMA DA FORMAÇÃO DE UM ESPORO .....   | 42 |
| FIGURA 8 - ESTRUTURA DE UM ESPORO MADURO .....  | 43 |
| FIGURA 9 - GERMINAÇÃO DE ESPORO BACTERIANO .....  | 47 |
| FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO BENEFICIAMENTO DOS GRÃOS DE SOJA, OBTENDO COMO CO-PRODUTO O MELAÇO E COMO RESÍDUO A VINHAÇA .....   | 52 |
| FIGURA 11 - COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES DA VINHAÇA E MELAÇO DE SOJA.....  | 54 |
| FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS REALIZADOS .....   | 57 |
| FIGURA 13 - FLUXOGRAMA PARA A OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO AQUOSA CONCENTRADA DE ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....  | 59 |
| FIGURA 14 - INDUÇÃO À ESPORULAÇÃO DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 EM MEIO DE CULTURA GELEIFICADO .....   | 62 |
| FIGURA 15 - RETIRADA DOS ESPOROS DA SUPERFÍCIE DO ÁGAR .....  | 63 |
| FIGURA 16 - FILTRAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS .....   | 63 |
| FIGURA 17 - ENVASE DAS AMOSTRAS COM OS MEIOS TESTADOS SOB CONDIÇÕES ASSÉPTICAS .....  | 66 |
| FIGURA 18 - SELAGEM DOS FRASCOS COM LACRES DE ALUMÍNIO .....  | 66 |
| FIGURA 19 - AMOSTRA DE FRASCOS COM MEIO SEPARADO EM GRUPOS DE 10 UNIDADES PARA A REALIZAÇÃO DA TERMORRESISTÊNCIA .....  | 67 |
| FIGURA 20 - AUTOCLAVE FABBE-PRIMAR .....  | 67 |
| FIGURA 21 - FRASCOS NO INTERIOR DA AUTOCLAVE .....  | 67 |
| FIGURA 22 - FLUXOGRAMA DOS TESTES DE VIABILIDADE E VERIFICAÇÃO DOS MEIOS PRODUZIDOS COM VINHAÇAS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR E MELAÇOS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR EM DIVERSAS  |    |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
|             | DILUIÇÕES .....   | 74  |
| FIGURA 23 - | FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DO MEIO CAPAZ DE QUANTIFICAR OS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 DANIFICADOS PELA AÇÃO DO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO .....                        | 78  |
| FIGURA 24 - | PLACA DE PETRI COM AS COLÔNIAS FORMADAS PELO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 EM CONTAGEM DE CÉLULAS PELO MÉTODO DA MICRO GOTA .....   | 91  |
| FIGURA 25 - | GRÁFICO DA CONTAGEM DE MICROORGANISMOS VIÁVEIS NA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....   | 92  |
| FIGURA 26 - | BOX-AND-WHISKER PLOT DA CONTAGEM DE MICROORGANISMOS VIÁVEIS DE INDICADORES BIOLÓGICOS COM <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....   | 94  |
| FIGURA 27 - | CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 EM TSB (tripticase soy broth) .....  | 95  |
| FIGURA 28 - | PORCENTAGEM MÉDIA DOS CARBOIDRATOS DETERMINADOS POR HPLC EM VINHAÇA DE SOJA ....  | 98  |
| FIGURA 29 - | AMOSTRAS DE FRASCOS COM CRESCIMENTO POSITIVOS (AMARELOS) E NEGATIVOS (VIOLETA) DOS MEIOS: padrão-CPPI (CONTROLE) E MEIOS VINHAÇA DE SOJA LOTES: 1-(1:25); 2-(1:40); 3-(1:50); 4-(1:60); 5-(1:70); 6-(1:80) E 7-(1:90) ..... | 104 |
| FIGURA 30 - | VALORES MÉDIOS DE $D_{121^{\circ}\text{C}}$ DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> SUSPENSOS NOS MEIOS PRODUZIDOS COM DIVERSAS DILUIÇÕES DA VINHAÇA DE SOJA .....   | 106 |
| FIGURA 31 - | VALORES DE $D_{121^{\circ}\text{C}}$ EM MEIOS COM VINHAÇA DE SOJA (1:70) ACRESCIDAS DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURAS .....   | 107 |
| FIGURA 32 - | TESTE DE VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....  | 108 |
| FIGURA 33 - | RELAÇÃO ENTRE O pH E O VALOR DE $D_{121^{\circ}\text{C}}$ DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 EM MEIO E-CPPI E VS+EL .....   | 110 |
| FIGURA 34 - | CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NO MEIO-1 (VS A 1:70 SEM CENTRIFUGAR) .....   | 112 |
| FIGURA 35 - | CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NO MEIO-2 (VS A 1:70 CENTRIFUGADA) .....  | 113 |
| FIGURA 36 - | CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NO MEIO-3 (PADRÃO E-CPPI) .....   | 113 |
| FIGURA 37 - | VALORES DE $U_{SK}$ , $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , TS, TM e Z PARA OS MEIOS: VS 1:70; VS+EL E PADRÃO ESTERITESTE-CPPI  |     |

|   |     |
|---|-----|
| (E-CPPI) .....  | 114 |
| FIGURA 38 – A) CURVA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NO MEIO VS: (A) O HORA; (B) 3 HORAS; (C) 6 HORAS; (D) 9 HORAS; (E) 12 HORAS; (F) 15 HORAS; (G) 18 HORAS; (H) 21 HORAS; (I) 24 HORAS; B) CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO NO MEIO VS .....          | 116 |
| FIGURA 39 – A) CINÉTICA DA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NO MEIO VS+EL: (A) O HORA; (B) 3 HORAS; (C) 6 HORAS; (D) 9 HORAS; (E) 12 HORAS; (F) 15 HORAS; (G) 18 HORAS; (H) 21 HORAS; (I) 24 HORAS; B) CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO NO MEIO VS+EL ..... | 118 |
| FIGURA 40 – A) GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NO MEIO CONTROLE E-CPPI: (A) O HORA; (B) 3 HORAS; (C) 6 HORAS; (D) 9 HORAS; (E) 12 HORAS; (F) 15 HORAS; (G) 18 HORAS; (H) 21 HORAS; (I) 24 HORAS; B) FIGURA 41 CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR NO MEIO CONTROLE E-CPPI .....  | 120 |
| FIGURA 41 – GERMINAÇÃO DOS ESPOROS PRESENTES NOS MEIOS: 1- VS; 2 – VS+EL E MEIO 3 - E-CPPI (CONTROLE) .....   | 121 |
| FIGURA 42 – CONSUMO DE CARBOIDRATOS PELO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 NA CINÉTICA DE GERMINAÇÃO – MEIO VS+EL .....   | 122 |
| FIGURA 43 – GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 no meio VS+EL .....   | 123 |
| FIGURA 44 – CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR E CONSUMO DE GLICOSE E PROTEÍNAS NO MEIO CONTROLE E-CPPI .  | 124 |
| FIGURA 45 – FRASCOS ANTES DA INCUBAÇÃO .....  | 125 |
| FIGURA 46 – FRASCOS APÓS 24 h DE INCUBAÇÃO .....  | 125 |
| FIGURA 47 – RESULTADO DO SEXTO DIA DE INCUBAÇÃO DO TESTE DE AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (TS) PARA O MEIO 3A-01/07 .....   | 127 |
| FIGURA 48 – TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (TS) DO LOTE 4B-02/06 .....  | 128 |
| FIGURA 49 – GERMINAÇÃO DOS ESPOROS NO MEIO 2B 02/06 COM INÓCULO DE 100 UFC.3ML APÓS 24HORAS DE INCUBAÇÃO .....  | 131 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DO MELAÇO DE SOJA .....  | 52 |
| TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....   | 53 |
| TABELA 3 - SUBSTRATOS DOS MEIOS PARA FES COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE .....   | 60 |
| TABELA 4 - SUBSTRATOS DOS MEIOS PARA ESPORULAÇÃO COM CASCA DE SOJA COMO SUPORTE .....  | 61 |
| TABELA 5 - FORMULAÇÃO DOS MEIOS COM VINHAÇAS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR PARA A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....   | 73 |
| TABELA 6 - FORMULAÇÃO DOS MEIOS COM MELAÇOS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR PARA A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....  | 73 |
| TABELA 7 - DILUIÇÃO SERIADA DECIMAL DA SUSPENSÃO CONCENTRADA DE ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....   | 76 |
| TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS UTILIZADOS NA CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953.....   | 76 |
| TABELA 9 - FORMULAÇÃO DOS MEIOS PARA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 COM DIVERSAS DILUIÇÕES DE VINHAÇA DE SOJA .....   | 80 |
| TABELA 10 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA COM VINHAÇA DE SOJA E VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURAS .....   | 81 |
| TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO AQUOSA DE ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , ATCC 7953 .....  | 86 |
| TABELA 12 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE GERMINATIVA DE ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....  | 86 |
| TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS PRODUZIDAS COM CASCA DE SOJA .....  | 88 |
| TABELA 14 - RESULTADOS DAS DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DAS SUSPENSÕES AQUOSAS DE ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 E DAS CONCENTRAÇÕES PADRONIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE INDICADORES BIOLÓGICOS ..  | 89 |
| TABELA 15 - RESULTADO DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 POR SEMEADURA POUR-PLATE E DE MICRO-GOTAS NA SUPERFÍCIE DO ÁGAR DE SOJA TRIPTICASEÍNA (TSA) ..... | 90 |

|  |     |
|--|-----|
| TABELA 16 - RESULTADO DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953, SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO .....   | 92  |
| TABELA 17 - RESULTADO DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DOS INDICADORES BIOLÓGICOS PARA ESTERILIZAÇÃO À VAPOR SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO .....  | 93  |
| TABELA 18 - QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS OBTIDAS NA CURVA DE CRESCIMENTO DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 EM TSB ...   | 94  |
| TABELA 19 - DETERMINAÇÃO DO GRAU BRIX NOS 14 LOTES DE VINHAÇA DE SOJA .....  | 96  |
| TABELA 20 - RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS EM AMOSTRAS DE DIFERENTES LOTES DE VINHAÇA DE SOJA .....  | 96  |
| TABELA 21 - QUALIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS POR HPLC NA VINHAÇA DE SOJA .....  | 97  |
| TABELA 22 - RESULTADOS DOS TESTES REALIZADOS NOS MEIOS COM RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA NOS MEIOS COM ESPOROS .....   | 100 |
| TABELA 23 - RESULTADOS DA VERIFICAÇÃO DOS MEIOS ESTUDADOS SEM ESPOROS .....  | 101 |
| TABELA 24 - RESULTADO DA VIABILIDADE NOS MEIOS PARA RECUPERAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR .....  | 102 |
| TABELA 25 - RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 PELO MÉTODO DA MICROGOTA, UTILIZANDO MEIO E-CPPI MODIFICADO, TSA (MARCA HIMÉDIA E MERCK) E VS 1:70 MODIFICADO. MEIO DE RECUPERAÇÃO VINHAÇA 1:70 .....                | 103 |
| TABELA 26 - RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 PELO MÉTODO DA MICRO-GOTA, UTILIZANDO MEIO ESTERITESTE-CPPI MODIFICADO, TSA (MARCA HIMÉDIA E MERCK) E VS 1:70 MODIFICADO. MEIO DE RECUPERAÇÃO ESTERITESTE-CPPI ..... | 103 |
| TABELA 27 - DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE $D_{121^{\circ}\text{C}}$ E $U_{\text{SK}}$ DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 SUSPENSOS NOS MEIOS PRODUZIDOS COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE VINHAÇA DE SOJA  | 105 |
| TABELA 28 - VALORES DE $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , $U_{\text{SK}}$ , TS e TM EM MEIOS COM VINHAÇA DE SOJA (1:70) COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURAS ....   | 107 |
| TABELA 29 - VALORES DE $U_{\text{SK}}$ , $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , TS E TM PARA ESPOROS DE <i>Geobacillus stearothermophilus</i> SUSPENSOS NOS MEIOS VS+EL SEM E COM AMIDO E O MEIO CONTROLE E-CPPI .....  | 108 |
| TABELA 30 - $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , $U_{\text{SK}}$ , TS e TM DE ESPOROS DE <i>Geobacillus Stearothermophilus</i> SUSPENSOS NO MEIO VS + EL  |     |

|  |     |
|--|-----|
| 1:70 COM DIVERSOS pHs .....  | 109 |
| TABELA 31 - $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , $U_{\text{SK}}$ , TS e TM DE ESPOROS DO <i>Geobacillus</i><br><i>stearothermophilus</i> SUSPENSOS NO MEIO<br>CONTROLE E-CPPI COM DIFERENTES pHs .....                                      | 110 |
| TABELA 32 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (ESPOROS E BACILOS) E<br>pH EM DIFERENTES TEMPOS NA GERMINAÇÃO DOS<br>ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC<br>7953 NO MEIO 1 (VINHAÇA DE SOJA A 1:70 SEM<br>CENTRIFUGAR) ..... | 111 |
| TABELA 33 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS) E<br>pH EM DIFERENTES TEMPOS NA GERMINAÇÃO DOS<br>ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC<br>7953 NO MEIO 2 (VS A 1:70-CENTRIFUGADA) .....                    | 111 |
| TABELA 34 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS) E<br>pH EM DIFERENTES TEMPOS NA GERMINAÇÃO DOS<br>ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC<br>7953 NO MEIO 3 (PADRÃO E-CPPI) .....                             | 111 |
| TABELA 35 - VALORES DE $U_{\text{SK}}$ , $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , TS, TM e Z OBTIDOS PARA<br>OS MEIOS VS+EL E PADRÃO ESTERITESTE-CPPI .....   | 114 |
| TABELA 36 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS),<br>pH E COLORAÇÃO DO MEIO POR TEMPO DE<br>INCUBAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus</i><br><i>stearothermophilus</i> NO MEIO VS .....  | 115 |
| TABELA 37 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS),<br>pH E COLORAÇÃO DO MEIO POR TEMPO DE<br>INCUBAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus</i><br><i>stearothermophilus</i> NO MEIO VS+EL .....                                     | 117 |
| TABELA 38 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS),<br>pH E COLORAÇÃO DO MEIO POR TEMPO DE<br>INCUBAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Geobacillus</i><br><i>stearothermophilus</i> NO MEIO VS+EL .....                                     | 119 |
| TABELA 39 - CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS<br>NA CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS<br>DANIFICADOS PELO CALOR NO MEIO VS+EL .....  | 121 |
| TABELA 40 - CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS<br>EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA<br>CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS<br>DANIFICADOS PELO CALOR NO MEIO CONTROLE<br>E-CPPI .....  | 123 |
| TABELA 41 - VIABILIDADE DOS ESPOROS SUSPENSOS EM MEIOS<br>COM E SEM EXTRATO DE LEVEDURAS .....   | 125 |
| TABELA 42 - CAPACIDADE DO MEIO SEM EXTRATO DE LEVEDU -<br>RAS EM GERMINAR OS ESPOROS DANIFICADOS<br>PELO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A 5 MINUTOS DE<br>AUTOCLAVAÇÃO A $121^{\circ}\text{C}/1\text{ATM}$ .....                             | 126 |
| TABELA 43 - CAPACIDADE DO MEIO SEM EXTRATO DE LEVEDU -<br>RAS EM GERMINAR OS ESPOROS DANIFICADOS<br>PELO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A 15 MINUTOS DE<br>AUTOCLAVAÇÃO .....  | 127 |
| TABELA 44 - CAPACIDADE DO MEIO COM EXTRATO DE LEVEDU -   |     |

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
|             | RAS EM GERMINAR ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A 5 MINUTOS DE AUTOCLAVAÇÃO .....   | 128 |
| TABELA 45 - | ANÁLISE DA CAPACIDADE DO MEIO COM EXTRATO DE LEVEDURAS EM GERMINAR OS ESPOROS DANIFICADOS PELA AÇÃO DO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A 15 MINUTOS DE AUTOCLAVAÇÃO .....    | 129 |
| TABELA 46 - | VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA SEM EXTRATO DE LEVEDURAS GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE 100 UFC.3mL <sup>-1</sup> .....     | 130 |
| TABELA 47 - | VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA COM EXTRATO DE LEVEDURAS GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE 100 UFC.3mL <sup>-1</sup> .....     | 130 |
| TABELA 48 - | VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA SEM EXTRATO DE LEVEDURAS GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE 1000 UFC.3mL <sup>-1</sup> .....    | 131 |
| TABELA 49 - | VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA COM EXTRATO DE LEVEDURAS EM GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE 1000 UFC.3mL <sup>-1</sup> ..... | 132 |
| TABELA 50 - | ESTUDO DE ESTABILIDADE DO MEIO VS 1:70+EL .....   | 132 |
| TABELA 51 - | FORMULAÇÃO E CUSTOS DOS MEIOS DOS CONTROLES E-CPPI E VS+EL PARA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....                             | 133 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1.0 - INTRODUÇÃO.....  | 18 |
| 2.0 - OBJETIVOS.....   | 23 |
| 2.1 - Objetivo geral .....   | 23 |
| 2.2 - Objetivos específicos .....  | 23 |
| 3.0 - REVISÃO DE LITERATURA .....  | 24 |
| 3.1 - Esterilização .....  | 24 |
| 3.2 - Indicadores biológicos .....   | 25 |
| 3.2.1 - Tipos de indicadores biológicos para monitoração de<br>Esterilização pelo calor úmido sob pressão .....                      | 27 |
| 3.2.1.1 - Indicadores biológicos de primeira geração .....   | 27 |
| 3.2.1.2 - Indicadores biológicos de segunda geração .....  | 28 |
| 3.2.1.3 - Indicadores biológicos de terceira geração .....   | 30 |
| 3.2.2 - Controles de qualidade dos indicadores biológicos .....  | 32 |
| 3.2.2.1 - Quantificação dos esporos .....  | 33 |
| 3.2.2.2 - Termorresistência dos microorganismos .....  | 33 |
| 3.2.2.3 - Determinação do valor de Z .....   | 37 |
| 3.2.2.4 - Determinação da janela de sobrevivência / morte .....  | 38 |
| 3.2.2.5 - Capacidade germinativa no tempo de sobrevivência (TS) e<br>tempo médio de morte (TM) .....                                 | 38 |
| 3.2.2.6 - Verificação da capacidade do meio em germinar após<br>submissão a esterilização adicional de 15 minutos .....              | 39 |
| 3.3 - <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , ATCC 7953 .....  | 39 |
| 3.4 - Esporos / esporulação .....  | 39 |
| 3.4.1 - Estrutura dos esporos .....  | 42 |
| 3.5 - Germinação de esporos danificados pela ação do calor úmido<br>sob pressão .....  | 44 |
| 3.6 - Meio de germinação .....   | 48 |
| 3.7 - Resíduos agroindustriais .....   | 51 |
| 3.8 - Uso de resíduos agroindustriais como meio de cultivo para<br>bactérias do genero <i>Bacillus sp</i> .....                      | 54 |
| 3.9 – Fermentação no Estado Sólido.....  | 55 |
| 4.0 - MATERIAL E MÉTODOS .....   | 57 |
| 4.1 - Produção e padronização da suspensão aquosa concentrada<br>de esporos do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 ..... | 57 |
| 4.1.1 - Microrganismo .....  | 58 |
| 4.1.2 - Recuperação e manutenção da cepa padrão .....  | 58 |
| 4.1.3 - Produção das suspensões aquosas concentradas de esporos .....  | 58 |
| 4.1.3.1 – Repiques .....   | 59 |
| 4.1.3.1.1 - Primeiro repique .....   | 59 |
| 4.1.3.1.2 - Segundo repique .....  | 59 |
| 4.1.3.1.3 - Terceiro repique / esporulação .....   | 60 |
| 4.1.3.2 - Recuperação dos esporos .....  | 63 |
| 4.1.3.3 - Controle de qualidade das suspensões aquosas de esporos .....  | 63 |
| 4.1.3.3.1 - Contagem de células viáveis totais .....   | 64 |
| 4.1.3.3.2 - Pesquisa de contaminantes .....  | 64 |
| 4.1.3.3.3 - Padronização das suspensões aquosas de esporos .....   | 64 |
| 4.2 - Estudo comparativo entre a metodologia oficial e o método<br>da micro-gota ou semeadura em superfície para contagem .....      |    |

|  |    |
|--|----|
| de células viáveis totais (pour-plate) .....   | 68 |
| 4.3 - Cinética de crescimento do <i>Geobacillus stearothermophilus</i><br>ATCC 7953 em meio industrializado (TSB) .....  | 69 |
| 4.4 - Avaliação de diferentes composições de meios de cultivo<br>formulados com resíduos e subprodutos agro-industriais na<br>germinação de esporos íntegros do <i>Geobacillus stearothermophilus</i><br>ATCC 7953 ..... | 69 |
| 4.4.1 - Meio padrão (controle) .....   | 69 |
| 4.4.2 - Meios com subprodutos/resíduos agroindustriais.....  | 70 |
| 4.4.2.1 - Avaliação da capacidade germinativa dos meios de cultura<br>produzidos com vinhaças (soja e de cana-de-açúcar) e melaços<br>(soja e cana-de-açúcar) .....  | 72 |
| 4.4.2.2 - Cinética de germinação dos esporos nos meios: vinhaça de<br>soja centrifugada, vinhaça de soja sem centrifugar e E-CPPI<br>(controle) .....  | 76 |
| 4.5-Avaliação da capacidade de promoção da germinação e<br>quantificação de esporos danificados pelo calor, de meios de<br>cultivo utilizando resíduos agroindustriais .....   | 77 |
| 4.5.1 - Meios para a germinação dos esporos .....  | 78 |
| 4.5.2 - Meios para quantificação dos esporos .....   | 79 |
| 4.6 - Determinação da interferência dos componentes do meio de<br>cultivo na germinação e determinação da resistência térmica<br>de esporos do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> danificados<br>pelo calor .....     | 79 |
| 4.6.1 - Concentração da vinhaça de soja .....  | 79 |
| 4.6.1.1 - Inoculo .....  | 79 |
| 4.6.1.2 - Meios .....  | 80 |
| 4.6.1.3 - Análises .....   | 80 |
| 4.6.2 - Extrato de leveduras .....   | 80 |
| 4.6.2.1 – Meios .....  | 80 |
| 4.6.2.2 – Inoculo .....  | 81 |
| 4.6.2.3 - Controles de qualidade .....   | 81 |
| 4.6.3 - Amido .....  | 82 |
| 4.6.4 - Cálcio .....   | 82 |
| 4.6.5 - pH .....   | 83 |
| 4.7 - Estudo comparativo entre meio de cultivo desenvolvido com<br>resíduo agroindustrial e o meio controle E-CPPI .....   | 83 |
| 4.8 - Cinética da germinação e consumo de nutrientes de esporos<br>do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 danificados<br>pelo calor úmido sob pressão .....  | 84 |
| 4.9- Validação da eficácia dos meios de cultura com resíduos da<br>agroindústria alimentar (vinhaça de soja) em germinar<br>esporos danificados de <i>Geobacillus stearothermophilus</i><br>ATCC 7953 .....              | 85 |
| 4.9.1 - Inoculo .....  | 85 |
| 4.9.2 - Meios .....  | 86 |
| 4.9.3 - Determinação da janela de sobrevivência / morte .....  | 87 |
| 4.10 - Estudos da estabilidade .....   | 87 |
| 5.0 - RESULTADOS .....   | 88 |
| 5.1 - Obtenção da suspensão aquosa concentrada de esporos de   |    |

|   |            |
|---|------------|
| <b><i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>5.2 - Estudo comparativo entre as metodologias de contagem de células viáveis totais oficial (pour-plate) da Farmacopéia Americana-USP 29 (2005) e o método da microgota ou semente em superfície .....</b>      | <b>90</b>  |
| <b>5.2.1- Suspensões aquosas de esporos .....</b>   | <b>90</b>  |
| <b>5.2.1.1- Avaliação da determinação de células viáveis totais pelas duas metodologias: <i>pour-plate</i> e micro-gota .....</b>   | <b>90</b>  |
| <b>5.2.1.2 - Interferência do choque térmico nos resultados obtidos na determinação das células viáveis sem e após tratamento térmico por 15 minutos a 95°C-100°C .....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>5.2.2 - Indicadores biológicos .....</b>   | <b>93</b>  |
| <b>5.2.2.1 - Avaliação da influência do choque térmico na determinação de células viáveis pelas metodologias - pour plate e micro-gota .....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>5.3 - Cinética de crescimento do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 em TSB (<i>Trypticase Soy Broth</i>) .....</b>  | <b>94</b>  |
| <b>5.4-Avaliação de diferentes composições de meios de cultivo formulados com resíduos e subprodutos agroindustriais na germinação de esporos íntegros do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 .....</b> | <b>95</b>  |
| <b>5.4.1 - Caracterização dos subprodutos/resíduos agroindustriais .....</b>  | <b>95</b>  |
| <b>5.4.2 - Avaliação da capacidade germinativa dos meios de cultura produzidos com vinhaças de soja (VS) e de cana-de-açúcar (VC) e melaços de soja (MS) e de cana-de-açúcar (MC) .....</b>                         | <b>98</b>  |
| <b>5.4.2.1 - Grupo COM ESPOROS .....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>5.4.2.2 - Grupo SEM ESPOROS .....</b>  | <b>100</b> |
| <b>5.5 - Avaliação da capacidade de promoção da germinação e quantificação de esporos danificados pelo calor, de meios de cultivo utilizando resíduos agroindustriais .....</b>                                     | <b>102</b> |
| <b>5.6 - Determinação da interferência dos componentes do meio de cultivo na germinação e determinação da resistência térmica de esporos do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> danificados pelo calor .....</b>  | <b>104</b> |
| <b>5.6.1 - Vinhaça de soja .....</b>  | <b>104</b> |
| <b>5.6.2 - Extrato de leveduras .....</b>   | <b>106</b> |
| <b>5.6.3 - Amido .....</b>  | <b>108</b> |
| <b>5.6.4 - Cálcio .....</b>   | <b>109</b> |
| <b>5.6.5- pH .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>5.7 - Cinética da germinação dos esporos do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 em meio com resíduo agro-industrial- vinhaça de soja (vs) e tripticase soy broth (TSB) .....</b>                     | <b>110</b> |
| <b>5.8- Estudo comparativo entre o meio de cultivo desenvolvido com resíduo agroindustrial e o meio controle E-CPPI .....</b>   | <b>114</b> |
| <b>5.9 - cinética da germinação e consumo de nutrientes de esporos do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 danificados pelo calor úmido sob pressão .....</b>  | <b>115</b> |
| <b>5.9.1 - Sem extrato de leveduras .....</b>   | <b>115</b> |
| <b>5.9.2 - Com extrato de leveduras .....</b>   | <b>117</b> |

|  |     |
|--|-----|
| 5.9.3 - Meio controle E-CPPI .....   | 118 |
| 5.10 - Validação da eficácia dos meios de cultura com resíduos da agroindústria (vinhaça de soja) em germinar esporos do <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953 ..... | 124 |
| 5.10.1 – Viabilidade .....   | 124 |
| 5.10.2 - Resistência térmica no tempo de sobrevivência (TS) e tempo médio de Morte (TM) .....  | 126 |
| 5.10.2.1 - Meios preparados sem extrato de leveduras .....   | 126 |
| 5.10.2.2 - Meios preparados com extrato de leveduras .....   | 127 |
| 5.10.2.3 - Pesquisa de contaminantes .....   | 129 |
| 5.10.2.4 - Verificação da capacidade do meio em germinar após ser submetido a esterilização adicional de 15 minutos .....  | 129 |
| 5.11 - Estudo da estabilidade .....  | 132 |
| 5.12 - Custos de produção .....  | 132 |
| 6.0 - DISCUSSÃO .....  | 134 |
| 7.0 – CONCLUSÃO .....  | 144 |
| 8.0 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA .....  | 145 |
| REFERÊNCIAS .....  | 146 |
| ANEXO .....  | 156 |



## 1.0 INTRODUÇÃO

Esterilidade, de maneira conceitual, refere-se à ausência de formas demonstráveis de vida. A morte microbiana de uma população homogênea é considerada uma função logarítmica, pois nem todos os organismos morrem simultaneamente e a população vai decrescendo com o tempo de exposição ao agente letal (PENNA, 1995). Sendo assim, atingir a ausência de microorganismos viáveis é matematicamente impossível, uma vez que para tanto seria necessário um tempo de esterilização infinito. Isto posto, percebe-se que a esterilidade é probabilística e não há garantia de sucesso absoluto.

A determinação de que um produto está estéril baseia-se em um nível de garantia de esterilidade ou *Sterility Assurance Level* (SAL) igual ou superior a  $10^{-6}$ , ou seja, a possibilidade de não esterilidade de uma unidade em um milhão. Porém, para obter o SAL, é necessário agregar medidas adicionais efetivas garantindo a segurança da esterilidade dos itens processados (SELLA, 1995; LEWIS, 2002; PENNA, 1997; LEWIS, 2002).

A necessidade em obter materiais estéreis não se limita apenas a estabelecimentos de atendimento à saúde, mas também à indústria farmacêutica e alimentícia.

O rigor no reprocessamento dos materiais utilizados no atendimento de pacientes submetidos a procedimentos diagnósticos, clínicos ou cirúrgicos em hospitais, clínicas médicas ou odontológicas é uma preocupação constante dos gestores destes estabelecimentos e agências de saúde como os órgãos reguladores. Assim, muita discussão, padronização de procedimentos e avanços tecnológicos têm sido realizados.

Em 1877, John Tyndall, um físico inglês, reconheceu a forma termorresistente das bactérias, o esporo, e desenvolveu métodos de esterilização para destruí-lo. Já em 1880, o bacteriologista francês e colaborador de Louis Pasteur, Charles Chamberland, construiu o primeiro esterilizador a vapor, que era semelhante a um "fogão de pressão", ficando este equipamento conhecido como a "Autoclave de Chamberland". Desde então inúmeros avanços vêm sendo aplicados na tecnologia de produção das autoclaves, mantendo-se o princípio da metodologia para destruir os microorganismos.

De acordo com Frazier (1985), os microorganismos e seus esporos diferem muito em sua resistência a altas temperaturas. Portanto, deve-se utilizar um método de esterilização eficaz, que garanta a segurança do usuário, permitindo a eliminação das formas de vida mais resistentes.

A esterilização de dispositivos médico-cirúrgicos hospitalares foi historicamente realizada em ambiente hospitalar devido às características de resistência dos materiais médicos utilizados. Este procedimento foi realizado por meio de diversas combinações tempo/temperatura, proporcionadas pelo vapor saturado sob pressão (ANSI/AAMI, 1998; PADOVEZE, 2003; SOBECC, 2000).

PENNA (1997) salienta que a escolha do método de esterilização a ser utilizado depende da natureza e da carga microbiana inicialmente presentes no material a ser processado, e que os efeitos do tratamento térmico sobre o material devem ser considerados, evitando a promoção de danos irreversíveis.

Devido à facilidade de manuseio e a rapidez dos ciclos, a autoclavação vem sendo amplamente utilizada para a esterilização de materiais termorresistentes. Além disso, tem a vantagem de ser uma metodologia barata, que não produz impacto ambiental, demanda temperaturas mais baixas e menor tempo de exposição que o método de calor seco (ANSI/AAMI, 2002).

A farmacopéia americana (USP 29, 2006) considera que a esterilidade de um produto deve ser baseada no fato de que o mesmo tenha sido processado em condições ótimas. Portanto, a eficácia dos processos de esterilização depende de um sistema consistente para diminuir e limitar a população de microorganismos inicial ou *bioburden*. Parâmetros apropriados para o processo de esterilização, como tempo e temperatura de exposição, qualidade do vapor, estabelecimento de embalagens e armazenamento adequados, devem ser adotados para se manter a esterilidade dos itens até o momento do uso (ANSI/AAMI, 2002).

Deve-se procurar manter a população microbiana inicial baixa nos produtos a serem esterilizados, providenciando a retirada mecânica de sujidades, principalmente matéria orgânica, por meio de processos adequados de lavagem e secagem prévias do material a ser processado. Os procedimentos de manipulação destes materiais também devem ser realizados com muito cuidado, evitando a contaminação excessiva e conseqüente dificuldade de esterilização.

Para que as esterilizações realizadas com o auxílio de autoclaves sejam efetivas, devem ser adotadas medidas rigorosas de controle, treinamento dos

técnicos para o uso correto do equipamento, manutenções periódicas e o uso sistemático de Indicadores Biológicos (IB) e químicos. A legislação preconiza que o uso rotineiro de IB deve ser de no mínimo uma vez por semana e deve ser repetido sempre que o equipamento passar por manutenção preventiva ou corretiva, sendo possível desta maneira, o acompanhamento da eficácia dos ciclos de esterilização (NBR ISO 11134, 2001; ANSI/AAMI ST 46, 2002; USP 29, 2006; NBR ISO 11138-1, 1994; FDA, 2001).

Esporos padronizados e termorresistentes do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 são recomendados para a produção de IB usados no monitoramento de esterilizações pelo calor úmido sob pressão (PENNA, 2000; BROWN, 1994; CARLBERG, 2005; SPICHER *et al.*, 1999; ISO 14161, 2000).

O uso de esporos bacterianos resistentes aos processos de esterilização, como IB, tem sido empregado para garantir a segurança dos usuários dos serviços de saúde. A destruição destas formas resistentes de vida garante a morte da população microbiana presente nos materiais processados, tendo em vista a maior vulnerabilidade destes ao agente esterilizante. Para tanto, deve-se considerar a resistência específica do esporo bacteriano à metodologia de esterilização empregada.

Após o término do ciclo de esterilização é necessário que se confirme ou não a destruição dos esporos. Geralmente são recomendados meios de cultura industrializados para avaliar a germinação de possíveis esporos sobreviventes.

Pflug *et al.* (1981) relataram que diferenças nas contagens dos esporos sobreviventes podem ser decorrentes do uso de diferentes meios ou lotes de um mesmo meio.

O IB do tipo autocontido consiste de um meio de cultura inoculado com uma suspensão de esporos conhecida e resistente a um método de esterilização específico. O meio de cultura deve possuir características que permitam a germinação de esporos sobreviventes, porém danificados pela ação do calor, ao procedimento de esterilização. O emprego de IB autocontidos facilita o manuseio do usuário, por não permitir a contaminação cruzada e ainda favorece um resultado mais fidedigno, pois os esporos sobreviventes ao processo de esterilização, poderão germinar no meio em que foram previamente testados.

O Esteriteste é um indicador biológico autocontido que auxilia no controle da efetividade dos processos de esterilização por calor úmido sob pressão realizados

por meio de autoclaves. Este produto é um dentre os vários produzidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), que é uma unidade da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Sendo uma instituição pública, não visa lucros e seu principal objetivo é atender às necessidades da população na promoção da saúde. Desde 1995 o Esteriteste vem sendo produzido e distribuído gratuitamente às unidades públicas de atendimento à saúde no estado do Paraná. É um produto já consagrado e possui registro no Ministério da Saúde sob o número: 101.731.00002.

Considerando que o tamanho (capacidade) da autoclave determina a quantidade de IB necessários para obter-se uma avaliação satisfatória do ciclo de esterilização, foi realizado um levantamento com as Regionais da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, para quantificar as necessidades dos potenciais usuários de IB. Dentre eles destacam-se postos de saúde, hospitais, laboratórios de análises clínicas, consultórios odontológicos das esferas municipal, estadual e federal. Nem todas as regionais responderam à solicitação, os dados parciais obtidos indicaram que a produção mínima para atender a demanda do Estado do Paraná seria de aproximadamente 250.000 mil IB / ano.

O custo médio da unidade de IB obtida comercialmente é de nove reais. O estado necessitaria desembolsar em torno de R\$ 2.250.000,00 por ano para o controle dos equipamentos existentes nas unidades consultadas.

O Ministério da Saúde, através da Coordenação geral dos laboratórios da rede pública (CEGELAB), já vem distribuindo o Esteriteste para alguns Laboratórios Centrais (LACENS) do país com possibilidade de ampliação deste fornecimento. Portanto, os valores acima determinados são subestimados, tendo em vista o mercado potencial.

Com a metodologia de produção atualmente adotada no CPPI, o custo do Esteriteste é 20% menor que os similares comerciais. Sendo o caldo de soja tripticaseína (TSB), um produto importado, o componente principal do meio de cultura do IB-Esteriteste, sua substituição por matéria prima regional poderá significar diminuição nos custos de produção e mais uma alternativa de destinação dos resíduos agroindustriais.

O aproveitamento de subprodutos e/ou resíduos da indústria agrícola em processos biotecnológicos agrega a minimização do impacto ambiental causado pelos efluentes com a diminuição do custo de produção dos produtos gerados,

justificando seu estudo e emprego. A grande maioria dos estudos enfoca o emprego dos resíduos na agropecuária, seja na forma de adubo ou como complemento nas rações alimentares de animais.

Avanços têm sido obtidos dentro da biotecnologia empregando tais resíduos ou subprodutos como substratos no cultivo de microorganismos que possam produzir produtos de interesse industrial como: enzimas, antibióticos, ácidos (ex. ácido cítrico) ou outro produto fruto das vias metabólicas de fungos, leveduras ou bactérias. As pesquisas realizadas trazem inúmeros benefícios, principalmente na área ambiental, pois minimizam o impacto causado pelos resíduos gerando economia pela substituição de matérias primas importadas e onerosas por matéria prima regional, diminuindo o custo de produção, fornecendo maior sustentabilidade aos processos.

O emprego de subprodutos e/ou resíduos da agroindústria em produtos a serem utilizados nos cuidados com a saúde humana é pouco desenvolvido. A idéia inovadora de empregá-los na produção do meio de cultura para a germinação dos esporos utilizados como indicadores biológicos da efetividade dos processos de esterilização, procurou aliar a minimização do impacto ambiental com a diminuição dos custos de produção.

Para a realização deste estudo, foram utilizados subprodutos e resíduos agroindustriais provenientes da indústria alcooleira (melaço e vinhaça de cana-de-açúcar) e de beneficiamento de soja (melaço e vinhaça de soja).

Considerando as propriedades nutritivas ainda remanescentes destes subprodutos e resíduos, foram realizados estudos para verificar a possibilidade de utilizar esta matéria-prima como principal componente do meio responsável pela germinação dos esporos danificados em indicadores biológicos para o controle das esterilizações pelo calor úmido sob pressão (autoclavação).

As análises realizadas foram baseadas em bibliografias oficiais como a farmacopéia americana – USP 29 (2006), *Food and Drug Administration* – FDA (2001), NBR ISO 11138-1 (1994), ISO 11138-3 (1995), que norteiam a produção de IB.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um meio de cultura, empregando subprodutos e/ou resíduos agroindustriais regionais como matéria prima nacional de baixo custo, com capacidade de fornecer condições para que esporos danificados pela ação do calor úmido sob pressão possam germinar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade da vinhaça de soja, vinhaça de cana-de-açúcar, melaço de soja e melaço de cana-de-açúcar em propiciar a germinação dos esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, danificados pela ação do calor úmido sob pressão;
- Substituir o Caldo de soja Trypticaseína (TSB) na formulação padronizada do meio de recuperação dos esporos utilizado pelo CPPI, por subproduto ou resíduo agroindustrial;
- Substituir metodologia oficial de contagem de células viáveis por método de menor custo;
- Avaliar o efeito do choque térmico na contagem de células viáveis totais;

### 3.0 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ESTERILIZAÇÃO

O emprego de calor nos procedimentos de esterilização de materiais é antigo e fácil de ser aplicado.

Duas formas de calor, úmido ou seco, são freqüentemente utilizadas para reduzir a população microbiana durante os procedimentos de descontaminação ou esterilização. O calor úmido refere-se ao vapor saturado (autoclaves), enquanto o calor seco usualmente refere-se ao ar quente (estufas). Segundo Carlberg (2005) e Penna (1997), o calor úmido é mais eficiente na eliminação dos microorganismos que o calor seco. Pois o efeito da umidade reduz a temperatura necessária para a desnaturação ou coagulação das proteínas dos microorganismos nas esterilizações em autoclaves (PENNA, 2002)

A esterilização de materiais através do calor úmido é muito difundida, principalmente em locais de assistência à saúde, porque é uma metodologia simples, barata, rápida e não poluente que traz poucos riscos ao manipulador e fornece resultados eficazes.

O responsável pela elevação da temperatura e formação da pressão no interior da autoclave é o vapor saturado. Deve-se retirar todo o ar do interior do equipamento para evitar bolsões de ar frio, impedindo que a temperatura desejada seja atingida, prejudicando a efetividade da esterilização (PENNA, 1994).

Para que os ciclos de esterilização pelo vapor saturado sob pressão (autoclavação) sejam eficientes, alguns fatores devem ser considerados: manutenção das boas condições de funcionamento da autoclave, limpeza prévia e secagem do material antes de embalar corretamente e respeito à capacidade do equipamento (utilizando somente 2/3 de sua capacidade, permitindo a circulação do vapor) (FONZI, *et al.*, 1999; MILLER e SHELDRAKE, 1999; NICKERSON *et al.*, 1990). O tempo de exposição dos materiais nas condições de esterilização (temperatura e pressão) é primordial para o sucesso do procedimento.

As autoclaves possuem sensores, que determinam a temperatura do interior dos equipamentos, porém não fazem distinção se a temperatura atingida corresponde a vapor úmido, vapor saturado, vapor superaquecido ou ar seco. O leitor de pressão fornece este dado sem diferenciar quais moléculas são

responsáveis pela leitura, monitorando somente o ponto onde está localizado o sensor sendo difícil afirmar que existe uma condição homogênea em todo o interior do equipamento.

O monitoramento dos parâmetros físicos nos ciclos de esterilização é determinado por aparatos mecânicos ou eletrônicos, que devem ser aferidos periodicamente. Porém a realização destes procedimentos de maneira rotineira é dificultada, pois a calibração requer equipamentos adequados e pessoal treinado.

Vários parâmetros estão envolvidos na obtenção das condições ideais de letalidade dos microorganismos e não existe um único aparelho capaz de fornecer todos os dados integrados.

Um prudente programa de esterilização necessita que seus parâmetros físicos e biológicos sejam devidamente acompanhados. Por isso é importante que os IBs acompanhem os ciclos de esterilização de maneira rotineira e não somente quando da qualificação do equipamento e validação do processo. Os IB são capazes de fornecer resultados que englobam a ação conjunta dos parâmetros estipulados para a correta esterilização dos materiais autoclavados, desde que utilizados de maneira correta.

Os IB permitem verificar se as condições de esterilização foram adequadas, porém não garantem a esterilidade dos itens submetidos ao processo. A limpeza prévia, o procedimento, o material empregado na embalagem dos utensílios e as condições de armazenagem após a esterilização, são fatores que somados ao processo de esterilização poderão garantir o sucesso do procedimento (ANSI/AAMI ST46, 2002).

### 3.2 INDICADORES BIOLÓGICOS

Para a validação dos ciclos de esterilização e condições de processamento, recomenda-se o uso de indicadores físicos e biológicos. Os indicadores físicos consistem de termopares conectados a um registrador de temperatura, que quando distribuídos em diferentes pontos da câmara e da carga a ser processada, medem a distribuição do calor, indicando os pontos frios. Geralmente não são utilizados de maneira rotineira, mas aplicados quando da instalação e qualificação do equipamento (SELLA, 1995).



Os indicadores biológicos, microorganismos resistentes ao agente esterilizante, são utilizados para verificar se as medidas físicas garantem o nível de esterilidade estabelecido (SELLA, 1995).

Indicadores biológicos têm sido usados há mais de oitenta anos para validar e monitorar processos de esterilização (HOLCOMB, 1973; KELSEY, 1961), consistem de um número conhecido de microorganismos com comprovada resistência ao modo de esterilização. Devem acompanhar a carga de material a ser esterilizada. O crescimento ou não do microorganismo em condições ideais de incubação, indicará a eficácia da esterilização (USP 29, 2006; ANSI/AAMI, 2002; ISO 11138-1, 1994; FDA, 2001). Esporos bacterianos são recomendados para a produção de IB, pois são significativamente mais resistentes que a microflora normal aos processos de esterilização. A padronização indica uma população conhecida de esporos com a resistência definida ao agente esterilizante

Os esporos utilizados para a produção de IB apresentam-se na forma de suspensão ou impregnados em tiras de papel, as quais não devem interferir na resistência do mesmo (PENNA, 2000; ANSI/AAMI ST46, 2002).

Os IBs devem ser acondicionados junto à carga de material em pontos estratégicos da autoclave ou estufa, para que a homogeneidade dos parâmetros de esterilização em todo o interior do equipamento seja avaliada. A capacidade (tamanho) do equipamento determina quantas unidades de IB devem acompanhar a carga.

Devido à cinética logarítmica de morte dos microorganismos, os IBs são usados para garantir o SAL (nível de segurança aceitável), assegurando que os parâmetros de mínima segurança sejam alcançados, ou seja, uma unidade contaminada em um milhão de unidades processadas (PENNA, 2000; USP 29, 2006).

O uso de IB é indicado quando da instalação de um novo equipamento, após a recolocação de equipamento já existente, após a manutenção preventiva ou corretiva das autoclaves e de rotina para o acompanhamento da performance dos equipamentos (ANSI/AAMI ST46, 2002; NBR ISO 11134, 2001; USP 29, 2006).

Algumas características dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953, como, capacidade de crescimento em temperaturas acima de 55°C, limitada tolerância a meios ácidos e alta resistência ao processo de esterilização pelo calor úmido, fazem com que seja o microorganismo de escolha para monitorar

esterilizações pelo emprego de autoclaves (PENNA, 2000; BROWN, 1994; CARLBERG, 2005; SPICHER *et al.*, 1999; ISO 14161, 2000).

Para que o desempenho do monitor biológico seja confiável, este deve apresentar características adequadas e padronizadas de concepção e controles de qualidade.

A utilização de IB com propósitos legais impôs alguns requerimentos para garantir a qualidade e padronização dos mesmos (SMITH, 1982; PINTO, 1992). Portanto, existem normas que regulamentam a produção comercial de indicadores biológicos orientando quanto à cepa específica do microorganismo para cada tipo de esterilização, população de esporos por unidade (frasco), controles de qualidade a serem executados como a determinação da sua termorresistência ao agente esterilizante (USP 29, 2006; FDA, 2001; ISO 11138-1, 1994; ISO 11138-3, 1995).

### 3.2.1 Tipos de indicadores biológicos para monitoração de esterilização pelo calor úmido sob pressão

A classificação dos IB é baseada na forma de apresentação e tempo de leitura dos resultados.

#### 3.2.1.1 Indicadores biológicos de primeira geração

Consistem de tiras ou discos de papel de filtro, vidro, plástico ou outro material, inoculados com uma população conhecida e padronizada de esporos do *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953, embalados em material que possa manter a integridade e viabilidade do inóculo, geralmente envelope de papel (USP 24, 2000), como demonstrado na FIGURA 1. Tanto o carreador como a embalagem primária (envelope), devem ser resistentes ao processo de esterilização e a ausência de algum tipo de contaminação química ou biológica que possa interferir no desempenho do IB deve ser observada. Após o ciclo de esterilização, o carreador inoculado com os esporos deve ser transferido para um meio de cultura com características que permitam a germinação dos esporos sobreviventes. A leitura final é realizada após 7 dias de incubação em estufa ou banho-maria a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ . A leitura do resultado é visual e obtida pela mudança de coloração do meio de cultura, que passará de violeta para amarelo.



FIGURA 1 - A) IB DE PRIMEIRA GERAÇÃO (FRASCOS COM O MEIO DE CULTURA ENVELOPES CONTENDO TIRAS DE PAPEL IMPREGNADAS COM ESPOROS; B) O PRODUTOR OFERECE SOMENTE AS TIRAS DE PAPEL IMPREGNADAS COM OS ESPOROS  
 FONTE: (A) FRILABOR E (B) INTERLAB

### 3.2.1.2 Indicadores biológicos de segunda geração

São denominados autocontidos (FIGURA 2). Estes IB podem ser encontrados em dois tipos de apresentação. Uma delas consiste de uma embalagem especial, onde uma tira de papel contendo esporos padronizados é mantida dentro de um tubo plástico maleável, juntamente com uma pequena ampola de vidro lacrada que contém um meio de cultura com características próprias e suficientes para propiciar a germinação dos esporos sobreviventes e danificados pela ação do calor. Este conjunto é fechado por uma tampa plástica que contém um filtro e orifícios que permitem a penetração do vapor sem riscos de contaminação. Após o procedimento de esterilização, a embalagem plástica é apertada até a ampola de vidro quebrar e o meio de cultura envolver o papel de filtro com os esporos. A outra apresentação consiste de ampolas ou frascos-ampola onde os esporos estão suspensos no próprio meio de germinação.

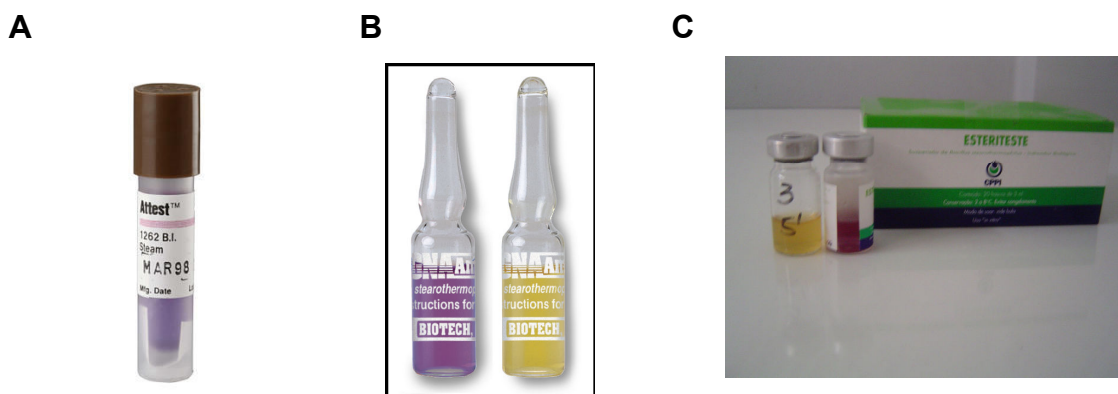


FIGURA 2 – A) IB AUTO-CONTIDO ATTEST 3M); B) IB AUTOCONTIDO BIOTECH; C) IB AUTO-CONTIDO ESTERITESTE-CPPI

FONTE: A) CIRÚRGICA PASSOS; B) [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com); C) O autor

Segundo Sella (1995), o mecanismo para destruir os esporos em um IB em ampolas ou frascos-ampola não ocorre pelo contato do vapor produzido na câmara de esterilização com o produto, devido à impermeabilidade do frasco, mas pelo aquecimento por condução e convecção.

O IB autocontido é composto por um sistema (frasco-ampola+produto), pois, a embalagem primária (frasco) interfere nos resultados devido à maneira como o calor se dissemina. O vapor em contato com o vidro do IB aquece suas paredes e transfere o calor para o líquido (meio de cultura) no interior do frasco. Desta maneira, a temperatura do líquido ao entrar em contato com as paredes de vidro, eleva-se, resultando na movimentação do fluído no interior do frasco-ampola, fazendo com que a pressão e temperatura no interior do frasco se igualem às da câmara de esterilização (JOSLYN, 1983; PRISTA *et al.*, 1979; SELLA, 1995) (FIGURA 3).

Geralmente os IBs neste tipo de apresentação apresentam valores para  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  superiores aos IBs que permitem o contato direto do vapor com os esporos.

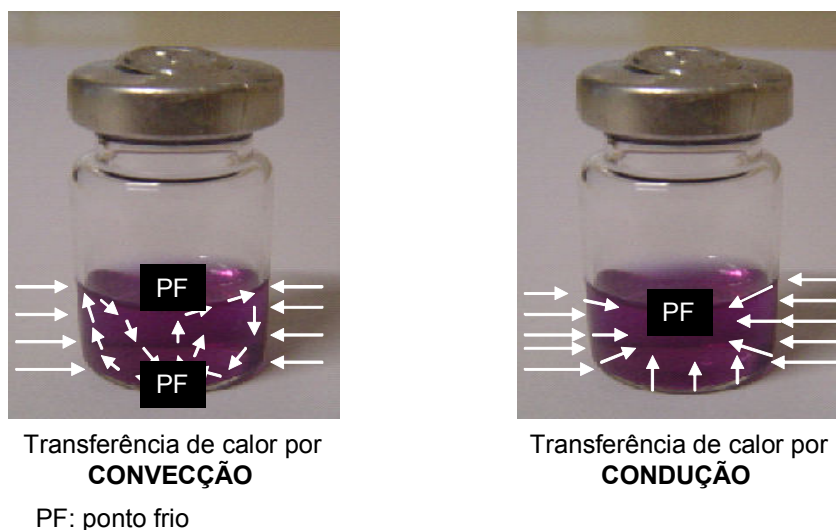


FIGURA 3 - TRANSFERÊNCIA DE CALOR ATRAVÉS DO FRASCO DE VIDRO DO IB  
AUTOCONTIDO  
FONTE: O Autor (2008)

Nas duas formas de apresentação, os IBs devem ser incubados em estufa ou banho-maria a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ . O resultado final é obtido em 24-48 horas. A leitura é realizada da mesma maneira que o IB de primeira geração, ou seja, pela observação de mudança na coloração do meio de cultivo.

### 3.2.1.3 Indicadores biológicos de terceira geração

Nestes IBs, a atividade enzimática do *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953 é detectada por fluorescência em equipamento especial (FIGURA 4). É considerado de leitura rápida, pois após três horas de incubação pode-se obter o resultado final. Se permanecer incubado revelará o resultado de maneira semelhante ao de segunda geração, ou seja, pela mudança de coloração do meio.



FIGURA 4 - INCUBADORA PARA IB DE TERCEIRA GERAÇÃO  
FONTE: CATÁLOGO 3M

Apesar dos IBs de terceira geração serem bem mais rápidos na obtenção dos resultados, os de primeira e segunda geração são mais acessíveis aos serviços públicos de saúde, pois necessitam apenas de uma estufa ou banho-maria para a incubação. Estes equipamentos geralmente são básicos para os laboratórios e podem ser utilizados para outros fins. O IB de segunda geração é mais seguro quanto ao resultado do que o de primeira geração, pois não há possibilidade de contaminação no manuseio que antecede a incubação dos testes e ainda o tempo de incubação é pelo menos três vezes menor no IB de segunda geração, sendo reduzido de sete dias para 48 horas.

Os indicadores biológicos contidos em tiras de papel apresentam maior estabilidade do produto (geralmente 18 meses contra 12 meses dos IB com os esporos suspensos na meio de revelação), porém são desvantajosos em relação ao autocontido por necessitarem de condições assépticas para a inoculação da tira no meio que irá propiciar a germinação dos esporos sobreviventes à esterilização. Outra desvantagem é a composição do meio germinativo, pois se o mesmo não for fornecido pelo fabricante, poderá gerar falsos resultados, porque os esporos danificados serão submetidos a condições nutricionais diferentes das utilizadas na produção do IB.

A apresentação dos IB de segunda geração na embalagem plástica com os esporos isolados do meio de cultura por uma pequena ampola de vidro, é mais recente e traz o benefício de ter o prazo de validade um pouco maior que o IB autocontido. Porém, quando o produtor do IB é uma instituição pública, muitas dificuldades são encontradas, principalmente por não se ter como meta o lucro e sim o atendimento às necessidades do usuário. A forma de apresentação em frasco-ampola tem a vantagem de não requerer altos investimentos na aquisição e manutenção de equipamentos como envasadoras especiais.

O resultado dos testes de IB baseia-se na sobrevivência ou não dos esporos resistentes ao processo de esterilização (FIGURA 5). A leitura é visual, ou seja, com mudança na coloração do meio de cultivo. Quando o fabricante do IB apenas recomenda o uso de TSB ou outro meio sintético capaz de germinar esporos danificados, a leitura é feita pela observação de turbidez no meio, indicando o desenvolvimento microbiano.

Quando o ciclo de esterilização não foi eficiente para destruir os esporos contidos no IB, os sobreviventes irão germinar e se reproduzir quando em contato

com nutrientes e temperatura adequados. O metabolismo dos componentes do meio de cultura irá gerar metabólitos ácidos, portanto, a presença de um indicador de pH no meio para a germinação dos esporos nos IB autocontidos permite a fácil visualização da germinação pela mudança de coloração.

Geralmente o púrpura de bromocresol é indicado, pois mantém o meio na coloração violeta em soluções alcalinas ou levemente ácidas (pH 6,0 a 8,0) e adquire a coloração amarela em pH ácidos (abaixo de 5,5) (SELLA, 1995).

### Fundamento do teste

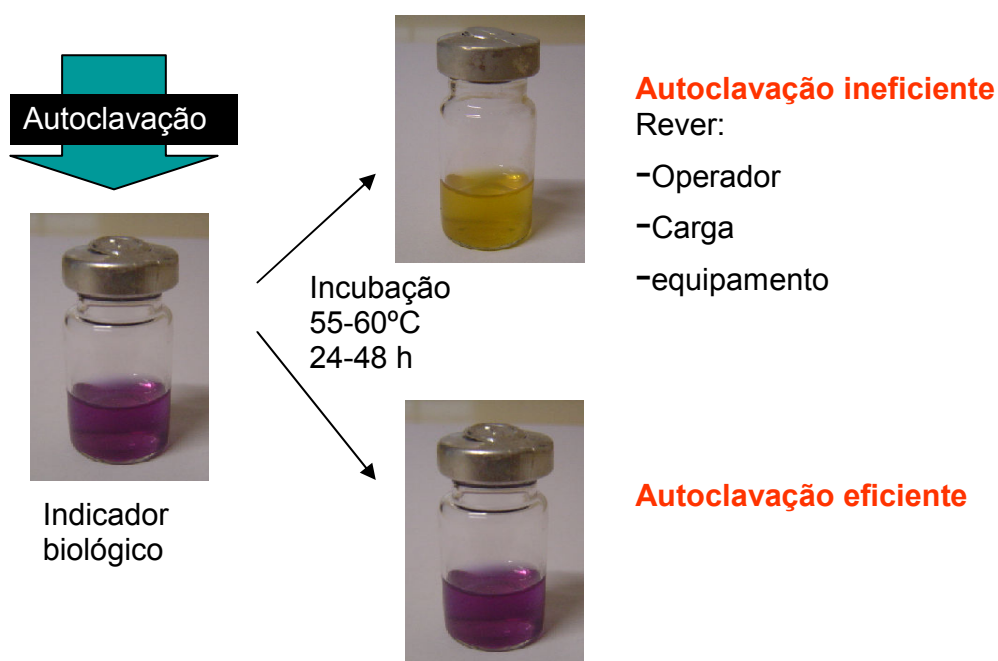


FIGURA 5 - ESQUEMA DO USO E AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE BIOINDICADORES AUTOCONTIDOS PARA CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO  
FONTE: O Autor (2008)

### 3.2.2 Controles de qualidade dos indicadores biológicos

Os IBs devem ser submetidos a controles de qualidade, obtendo-se desta maneira parâmetros que garantirão a qualidade do produto, permitindo seu uso com segurança no monitoramento de processos de esterilização por autoclaves.

A USP 29 (2006) recomenda a quantificação dos esporos por unidade de IB através da contagem de UFC pelo método da inoculação profunda em ágar (*Pour-plate*). A determinação da termorresistência é obtida pela determinação do valor de

D (tempo de termodestruição – tempo necessário para que haja morte de um log ou 90% da população microbiana),  $U_{sk}$  (tempo médio de morte) pelo método Spearman-Kärber, a janela do tempo de sobrevivência/morte e o valor de Z (graus Celsius necessários para alterar em um log o valor de D). Quando se avalia um IB autocontido, a USP 24, 2000, recomenda a avaliação da capacidade germinativa do meio de cultura após exposição às condições de autoclavação.

#### 3.2.2.1 Quantificação dos esporos

A população inicial ( $N_0$ ) dos esporos no indicador biológico deve ser conhecida pois é necessária para a determinação dos valores de D e  $U_{sk}$ .

A determinação da população é interdependente da termorresistência dos esporos, pois quanto maior a resistência dos esporos, menor deverá ser a população para que os valores de D não sejam demasiadamente altos, impedindo que o IB exerça sua função.

A ISO 14161 (2000) recomenda que a população de esporos em um IB não deve ser menor que  $10^3$  por unidade, ou seja, por tira de papel ou por frasco dos IB autocontidos. Enquanto que a USP 29 (2006) determina uma faixa de  $10^4$  a  $10^9$  esporos por unidade de IB. O FDA (2001) recomenda uma população de  $10^5$  UFC/unidade de IB e a ISO 11138-3 menciona uma população de  $10^5$  UFC/unidade quando o IB for utilizado na rotina e de  $10^6$  UFC/unidade, quando for utilizado para qualificar os equipamentos esterilizadores.

O que irá determinar a população de esporos dos IBs é a termorresistência apresentada pela suspensão de esporos avaliada pelo valor de D obtido pelos controles de qualidade. É importante salientar que estes valores são inerentes a cada lote de suspensão de esporos.

#### 3.2.2.2 Termorresistência dos microorganismos

Para que um microorganismo possa ser utilizado como IB é necessária a determinação de sua resistência ao método de esterilização escolhido. O valor de D ou tempo de redução decimal é o tempo em minutos a uma determinada temperatura de tratamento para que haja a redução em 90% (um log) da população microbiana inicialmente presente no produto (PENNA, 1995; USP 29, 2006; LEWIS,



2002). O valor de D reflete a termorresistência dos esporos a determinadas condições de esterilização, como temperatura e pressão constantes (SELLA, 1995). Segundo a ISO 14161 (2000), o valor de D pode ser determinado por várias maneiras, mas as duas principais são: o método da enumeração direta e o método da fração negativa.

A Farmacopéia Americana USP 29 (2006) recomenda que o valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  (tempo de redução decimal) esteja entre 1,5 minutos e 3 minutos, o FDA (2001) e a ISO 11138-3 (1995) fazem referências apenas ao valor mínimo de 1,5 minutos.

O tempo médio de morte (Usk) corresponde ao tempo médio de autoclavação necessário para matar toda a população microbiana a uma determinada temperatura, ou ainda, é o menor tempo necessário para a eliminação de mais de 99% do número inicial de microorganismos (ANSI/AAMI ST 34, 1991). Pode ser determinado pelo método Spearman-Kärber ou pela curva de sobreviventes (SELLA, 1995). A USP 22 (1990) sugere que o valor mínimo para o tempo médio de morte seja de oito minutos, enquanto a USP 29 (2006), estabelece que deva estar entre 13,5 minutos e 32 minutos, dependendo do valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ .

O número inicial de microorganismos ( $N_0$ ), o tempo de redução decimal (D) e o tempo médio de morte (Usk), deverão ser avaliados interrelacionadamente para uma avaliação completa da qualidade e comportamento do indicador biológico (SELLA, 1995).

#### a) Método da enumeração direta

Este método requer a contagem de colônias em um meio sólido. Pode sofrer interferência de uma variedade de fatores como a diluição, erro de pipetagem, manipulação (falta de treinamento/qualificação do operador), o meio de cultura utilizado e o número de colônias formadas por placa, sendo aceitável entre 30 e 300 UFC (ISO 14161, 2000; USP 29, 2006). Calcula-se o valor de D graficamente, colocando-se na ordenada o logaritmo do número de esporos viáveis (obtido pela contagem de colônias) e na abscissa os tempos correspondentes de exposição à temperatura do processo (ISO 11138-1, 1994). Não indicado para indicadores biológicos em frascos-ampola (ANSI/AAMI ST34, 1991).

b) Método da fração negativa

Chamado também de quantal ou análise do número mais provável (MPN). São métodos estatísticos, onde os resultados são obtidos pela observação do número de IB que apresentaram crescimento ou não. Quatro métodos enquadram-se dentro destas características (ISO 14161, 2000):

b.1) Spearman-Kärber (SK)

Aplicado quando o intervalo de tempo entre as esterilizações e o número de amostras é constante (ISO 14161, 2000; ISO 11138-1, 1994). Como exemplo, pode-se expor as amostras aos tempos de: 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 minutos, observando-se que o intervalo entre os tempos de autoclavação é de 2,5 minutos. A USP 24 (2000) orienta o uso de dez IB por grupo, sendo a amostragem dobrada no caso de resultado insatisfatório e a ISO 11138-1 (1994) salienta que esta amostra não deve ser menor que vinte unidades. O resultado é obtido por cálculo com a aplicação de fórmulas (ISO 11138-1, 1994; ISO 14161, 2000).

Para calcular o valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , recomenda-se a aplicação da fórmula:

$$D_{121^{\circ}\text{C}} = \left( \frac{U_{sk}}{\log N_0 + 0,2507} \right)$$

O valor de  $U_{sk}$  é obtido por:

$$U_{sk} = tk - \frac{d}{2} - \left( \frac{d}{n} \sum \frac{r}{n} \right)$$

A variância para  $U_{SK}$ , pode ser obtida por:

$$VT = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum_{l=1}^{k-1} f_l(n-f_l)$$

O desvio padrão pode ser calculado por:

$$ST = \sqrt{VT}$$

Os limites mínimo e máximo com 95% de confiança para o valor de  $D_{121^\circ\text{C}}$ , podem ser calculados pela equação:

$$D_{121^\circ\text{C}} = \frac{U_{SK} \pm 2ST}{\log N_0 + 0,2507}$$

Onde:

$D$  = tempo de termodestruição

$U_{SK}$  = tempo médio de morte

$d$  = intervalo entre os tempos de aquecimento

$t_k$  = primeiro intervalo de tempo onde todas as amostras apresentaram crescimento negativo

$r$  = número de amostras que não apresentaram crescimento a cada tempo de aquecimento entre  $t_1$  e  $t_k$

$n$  = número total de amostras a cada tempo

#### b.2) Holcomb-Spearman-Karber (HSK)

Método similar ao SK, usa uma fórmula genérica a qual não requer o uso de muitas amostras e nem intervalo de tempo constante.

$$D = \frac{\hat{\mu}}{\log_{10} + 0,2507}$$

Onde:

$$\hat{\mu} = \sum_{i=1}^{k-1} \mu_i$$

#### b.3) Stumbo-Murphy-Cochran (SMC)

Para obter resultados válidos, os cálculos devem ser realizados em triplicata para confirmar a reprodutibilidade.

$$D = t / \left[ \log_{10} N_0 - \log_{10} \left( \ln \frac{n}{r} \right) \right]$$

#### b.4) Stumbo-Murphy-Cochran limitado (SMCL)

São requeridos um mínimo de 40 IB, para os dados serem equivalentes ao método SK.

#### 3.2.2.3 Determinação do valor de z

O valor de "Z" representa o intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição, ou seja, determina quantos graus a temperatura de processamento deve aumentar para que o tempo de processamento possa sofrer uma redução decimal. Quanto menor o valor Z, tanto maior a variação da velocidade de destruição com a temperatura de exposição (STUMBO, 1973; TOLEDO, 1991; PENNA, 1997).

O valor de Z é usado somente para processos de esterilização por calor úmido e corresponde aos graus de temperatura necessários para alterar em um log o valor de D (FDA, 2001; USP 29, 2006).

O valor de Z pode ser obtido por um estudo com a determinação de vários valores de D em diferentes temperaturas e construindo-se uma curva de termorresistência (FDA, 2001) ou por meio de cálculo, utilizando-se a fórmula (ISO 11138-3, 1995):

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2}$$

Onde  $D_1$  e  $D_2$  são os valores de D obtidos nas temperaturas  $T_1$  e  $T_2$ , respectivamente.

Segundo a ISO 11138-3 (1995) deve-se determinar os valores de D em duas diferentes temperaturas de autoclavação, recomendando valores entre 110°C e 130°C. A mesma norma cita que o valor de Z não deve ser menor que 6±0,1°C enquanto o FDA (2001) recomenda que o valor mínimo deva ser de 10°C.

### 3.2.2.4 Determinação da janela de sobrevivência / morte

A janela de sobrevivência/morte é a faixa de tempo de exposição para um processo de esterilização sob condições definidas, quando todos os indicadores biológicos deverão apresentar crescimento no tempo de sobrevivência e todos os indicadores deverão apresentar ausência de crescimento no tempo de morte (USP 24, 2000; USP 29, 2006; FDA, 2001).

O tempo mínimo de esterilização para que haja sobrevida de todos os esporos (TS) e o tempo mínimo para que ocorra a morte de todos os esporos (TM) num indicador biológico, podem ser determinados pelas seguintes equações (USP 24, 2000; USP 29, 2006):

Tempo de sobrevivência –TS (não deve ser menor que):

$$\text{Valor de } D \times (\log_{10} \text{ da população de esporos viáveis} - 2)$$

Tempo de morte - TM (não deve ser maior que):

$$\text{Valor de } D \times (\log_{10} \text{ da população de esporos viáveis} + 4)$$

A USP 29 (2006), determina que o tempo de sobrevivência e o tempo de morte não devem ser inferiores a 4,5 minutos e 13,5 minutos, respectivamente, e os valores máximos não devem ultrapassar a 14 minutos para o tempo de sobrevivência e 32 minutos para o tempo de morte. Portanto, a janela de sobrevivência/morte deverá corresponder à faixa de tempo entre 4,5 minutos e 32 minutos.

### 3.2.2.5 Capacidade germinativa no tempo de sobrevivência (TS) e tempo médio de morte (TM)

Esta metodologia deve ser aplicada quando se deseja verificar a capacidade do meio em fornecer condições para a germinação dos esporos danificados pela ação do calor após submissão à autoclavação nos tempos de sobrevivência (TS) de cinco minutos e no tempo médio de morte (TM) de quinze minutos (USP 24, 2000).

### 3.2.2.6 Verificação da capacidade do meio em germinar após submissão a esterilização adicional de 15 minutos

A USP 24 (2000) salienta que o meio para germinação dos esporos danificados durante o procedimento de autoclavação deve ser avaliado, pois é submetido a duas autoclavações: uma quando é produzido e outra quando acompanha os materiais a serem esterilizados pela autoclave na forma de IB. Portanto pode sofrer alterações na sua composição devido à ação do calor.

### 3.3 *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953

O *Bacillus stearothermophilus* ATCC (*American Type Culture Collection*) 7953 classificado por Donk em 1920, foi renomeado como *Geobacillus stearothermophilus* por Nazina *et al.* em 2001. Caracteriza-se por ser um bacilo gram positivo, apatogênico, que apresenta reações de catalase e hidrólise do amido positiva e reação de Voges - Proskauer negativa (SELLA, 1995). Segundo Sella (1995), fermenta a glicose sem a formação de gás. Nazina *et al.* (2001) afirmam que o mesmo ocorre com a frutose, maltose, manose e sucrose.

Possui capacidade de crescimento em temperaturas que variam de 55 °C - 65°C, portanto está dentro da classificação de microorganismos termofílicos (SELLA, 1992; PENNA, 2000; NAZINA *et al.*, 2001).

Desenvolve-se em uma faixa de pH de 6,0 a 8,5. Nazina *et al.* (2001), citam como ponto ótimo, pH entre 6,5 e 7,0, enquanto Foester (1993) sugeriu entre 6,0 e 7,5, sendo portanto considerado um microorganismo neutrófilo.

Forma endosporos termorresistentes que são comumente usados como organismos para o preparo de indicadores biológicos (IB), na validação e monitoramento dos processos de esterilização pelo calor úmido sob pressão nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e serviços de atendimento à saúde em geral, por apresentarem resistência aos ciclos de autoclavação (OCIO *et al.*, 1996; USP 29, 2006; SELLA, 1992).

### 3.4 ESPOROS / ESPORULAÇÃO

A habilidade de alguns microorganismos sobreviverem a condições ambientais extremas é particularmente determinada pela capacidade de proteger

seu DNA contra a ação danosa de agentes físico-químicos como: temperatura, osmolaridade, disponibilidade de nutrientes e densidade celular.

Muitas vezes estas variações impõem ao microorganismo um crescimento lento ou de fase estacionária. Nestas condições, em um esforço para manter o crescimento mesmo a taxas reduzidas, as células procuram adaptar-se ao ambiente, desenvolvendo motilidade, produzindo antibióticos ou enzimas extracelulares. A determinação de esporular só é tomada quando todas as opções para manter um metabolismo ativo, por mínimo que seja, se esgotam, representando uma atitude drástica do microorganismo para manter-se vivo em condições adversas (REAL e HENRIQUES, 2001; SETLOW, 2007).

O processo de esporulação não envolve multiplicação, pois, cada célula vegetativa dá origem a um único esporo e na subsequente germinação, cada esporo produz somente uma célula vegetativa (PENNA, 1995).

A aparência do esporo maduro varia conforme a espécie, podendo ser esférico, ovóide ou alongado. Pode ocupar uma posição terminal, subterminal ou central e se for mais largo do que a célula mãe, esta poderá adquirir um aspecto bojudado. Estas características importantes do esporo podem auxiliar na caracterização de certas espécies bacterianas. A simples observação de que uma bactéria é esporulada (FIGURA 6), limita a sua possível identidade às espécies de um número muito reduzido de gêneros. O processo da esporulação é regulado pela proteína SpoA, que determina a ativação ou repressão de genes de expressão (PAIDHUNGAT *et al.*, 2000; SETLOW, 2007).



FIGURA 6: MICROGRAFIA ELETRÔNICA COLORIZADA DE UM BACILO COM UM ENDOSPORO AINDA NO INTERIOR DA CÉLULA

FONTE: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia3/morfologia3.html>

Esporos são muito mais resistentes aos efeitos do calor, dessecação, congelamento, substâncias químicas tóxicas e radiações do que as células

vegetativas (SETLOW, 2007; USP 29, 2006; CAZEMIER, WAGENAARS E STEEG, 2001).

Algumas características diferem a célula vegetativa dos esporos, conferindo-lhes grande resistência, como a impermeabilidade do córtex e da camada externa (capa), elevada quantidade de cálcio e ácido dipicolínico, baixo teor de água (5 a 20%) e atividade metabólica e enzimática mínima (SETLOW, 2007).

A resistência dos esporos formados depende de fatores ambientais, como temperatura e tempo de incubação, presença de oxigênio, pH e composição do meio (PENNA, 2000; MARQUIS e BENDER, 1985; RASO *et al.*, 1998; GONZÁLEZ *et al.*, 1999; PALOP *et al.*, 1999; GERHARDT e MARQUIS, 1989; CAZEMIER, 2001). A indução da esporulação por sais de manganês, magnésio e potássio e o aumento da resistência dos esporos pela presença de cálcio e incubação a altas temperaturas, permitem a produção de esporos termorresistentes, pois aumentam a mineralização e a desidratação do protoplasto (BEAMAN *et al.*, 1984; BEAMAN e GERHARDT, 1986; CAZEMIER, 2001; PENNA, 2000; PINTO, 1992;).

Esporos de algumas espécies de *Bacillus* e *Clostridium* exibem na água um indetectável metabolismo de compostos endógenos e exógenos, podendo sobreviver a tratamentos com calor seco ou úmido, radiações gama ou ultravioleta, dessecação e agentes químicos, que facilmente matariam as células vegetativas (SETLOW, 2007; CROOK, 1952). A baixa permeabilidade da parede celular a pequenas moléculas e à água, é o principal fator da resistência dos esporos a muitos agentes químicos, principalmente os que agem danificando o DNA da célula (SETLOW, 2007).

Considerando-se esta característica de resistência e a apatogeneicidade dos esporos de alguns bacilos gram positivos, têm-se usado esporos oriundos destas bactérias como indicadores biológicos em processos de esterilização. Particularmente o *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953 para o calor úmido sob pressão e peróxido de hidrogênio e o *Bacillus atrophaeus*, ATCC 9372 para calor seco e óxido de etileno (USP 29, 2006; SELLA, 1992; PENNA, 2000).

O processo de esporulação (FIGURA 7), é dividido em sete estágios. No estágio I há a formação de um filamento axial do material do nucleóide. No estágio II a membrana começa a invaginar-se de maneira a revestir o DNA, formando um septo. Durante o estágio III, o pré-esporo é envolto pela membrana, formando um segundo envoltório. No estágio IV há deposição do córtex entre as duas membranas



e o acúmulo de dipicolinato de cálcio. No estágio V as proteínas da capa se estruturam sobre o córtex. No estágio VI o esporo sofre maturação. No estágio VII ocorre a liberação do esporo formado (também chamado de esporângio), após a ruptura da estrutura da célula bacteriana pela ação de enzimas líticas (SETLOW, 2007).

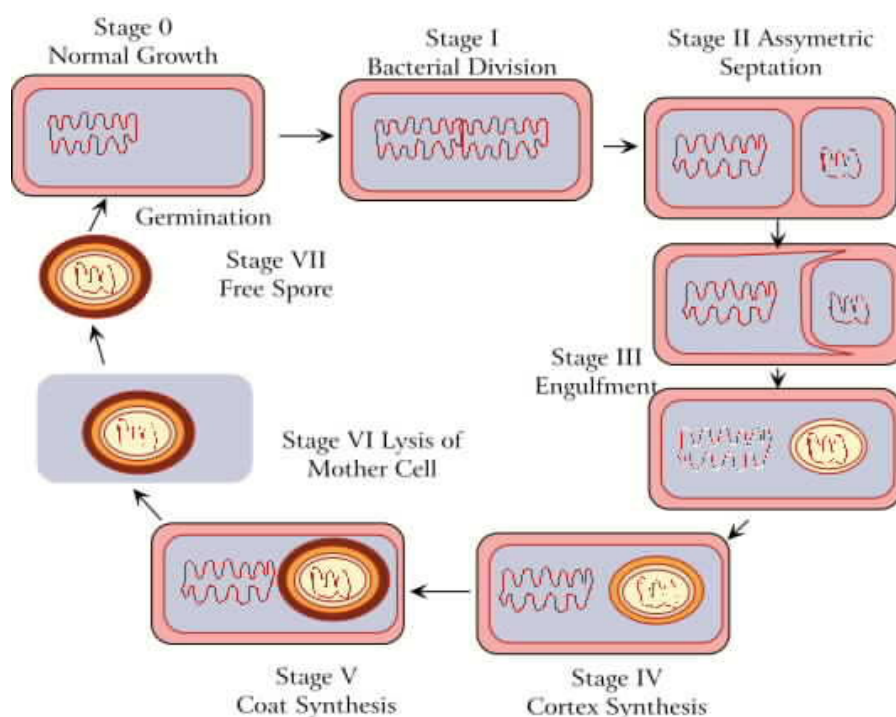


FIGURA 7 – ESQUEMA DA FORMAÇÃO DE UM ESPORO

FONTE: <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/Inclusions.html>

### 3.4.1 Estrutura dos esporos

A termorresistência dos esporos pode ser atribuída principalmente à desidratação do protoplasto, favorecida pela alta temperatura de incubação, sua mineralização e a termo adaptação do microorganismo (BEAMAN *et al.*, 1984; BEAMAN e GERHARDT, 1986; CAZEMIER *et al.*, 2001). Contudo, Setlow (2007), apresentou estudos revelando que a resistência dos esporos deve-se principalmente a dois fatores. O primeiro seria a proteção do DNA contra possíveis danos através de estruturas resistentes compostas por altos níveis de dipicolinato de cálcio e o segundo a capacidade regenerativa do DNA danificado, através de pequenas proteínas ácido-solúveis (SASP) o que ocorre somente quando há germinação do

esporo. As SASP são sintetizadas no desenvolvimento do esporo e são degradadas após a germinação.

A estrutura de um esporo maduro retratado na FIGURA 8 é constituída de:

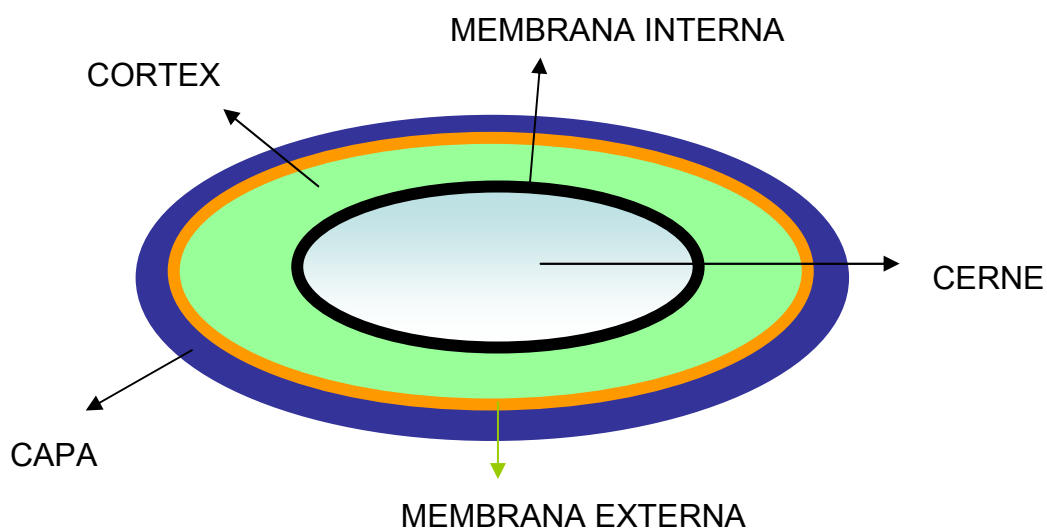


FIGURA 8 – ESTRUTURA DE UM ESPORO MADURO  
FONTE: O autor (2008)

- Capa : é constituída de inúmeras proteínas. Protege o esporo da ação de enzimas líticas, como a lisozima e de alguns agentes químicos tóxicos (SETLOW, 2007; NICHOLSON, 2000).
- Membrana externa: está localizada logo abaixo da capa, é essencial para a formação do esporo, porém não é uma barreira de permeabilidade no esporo maduro (SETLOW, 2007).
- Córtex: é formado predominantemente por peptidoglicanas. Tem papel importante na germinação do esporo. Contribui para a resistência, controlando a quantidade de água contida no protoplasto (WARTTH *et al.*, 1963; SETLOW, 2007). Durante a germinação é rapidamente degradada por enzimas líticas presentes no esporo dormente (DE VRIES, 2006).
- Membrana interna: tem pouca permeabilidade para pequenas moléculas, inclusive para a água, sendo um fator de resistência do

esporo para agentes químicos que poderiam danificar o DNA (SETLOW, 2007). É uma estrutura importante na resistência e germinação do esporo (DE VRIES, 2006).

- Cerne: é a parte central do esporo (cerne) contém o DNA, RNA e a maior quantidade de enzimas. A baixa quantidade de água presente nesta parte do esporo (25-50% do peso seco – dependendo da espécie), contribui para a longevidade, dormência e resistência dos esporos (BEAMAN *et al.*, 1982; 1984; GOULD, 1986; NAKASHIO e GERHARDT, 1985; RUSSELL, 2003; SETLOW, 1994; 2000; 2005).

O cerne contém grandes quantidades de um tipo particular de pequenas proteínas ácido solúveis (SASP - *acid-soluble spore proteins*) (POTTS, 1994; SETLOW, 1994; 1998; 2000; 2005; 2007). Estas proteínas formam um complexo com o DNA do esporo, mantendo-o comprimido em um formato que irá protegê-lo contra possíveis danos (SETLOW, 1988; 1995).

O citoplasma do cerne contém grande quantidade de cátions divalentes, principalmente cálcio, o qual forma um complexo com um composto específico do esporo, o piridina-2,6-ácido dicarboxílico (ácido dipicolínico ou ADP) (POWELL, 1953). O ADP é associado à desidratação do cerne e à resistência a fatores como calor e radiações UV (PAIDHUNGAT *et al.*, 2000).

A quantidade de ADP no centro do esporo é controversa, pois segundo Halvorson e Howitt (1961) e Murrell e Warth (1965), a quantidade de ADP é alta, ficando em torno de 5-15% do peso total do esporo, Paidhungat *et al.* (2000) fazem menção a 10% do peso seco e Setlow (2005) menciona aproximadamente 20% do peso seco.

### 3.5 GERMINAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELA AÇÃO DO CALOR ÚMI - DO SOB PRESSÃO

Uma das características do esporo maduro é a sua inércia em relação a numerosos substratos exógenos, até que se inicie a germinação.

Segundo Keynan (1969) e Hashimoto (1969), germinação é a conversão irreversível de esporos bacterianos dormentes para a forma celular metabolicamente ativa. Desta forma, o esporo sofre a perda de algumas características peculiares, principalmente a resistência a fatores adversos, como agentes químicos ou físicos.

Condições ambientais favoráveis possibilitam a germinação dos esporos, sendo os agentes nutricionais e a temperatura os de maior impacto, considerando-se as necessidades individuais de cada microorganismo (EDWARDS *et al.*, 1965, ADAMS, 1978, FEEHERRY *et al.*, 1987).

A germinação de esporos danificados quando submetidos a condições fortemente adversas é muito mais difícil do que a de esporos íntegros.

A manutenção de uma suspensão que contenha predominantemente esporos dormentes deve ser em uma solução não nutritiva (USP 29, 2006). Os esporos possuem biosensores capazes de recuperar as características de célula metabolicamente ativa frente à presença de nutrientes germinantes específicos, que podem ser um simples aminoácido, açúcar ou nucleosídeo (MOIR, 2006; SETLOW, 2005).

Moir (2006) define a germinação dos esporos como um processo essencialmente biofísico, no qual os esporos perdem algumas propriedades específicas. Ele ocorre sem a necessidade de novas sínteses de macromoléculas, pois os aparatos requeridos encontram-se no esporo maduro dormente. Ainda segundo Moir (2006), a germinação em resposta a determinados nutrientes químicos, requer receptores protéicos específicos localizados na membrana interna do esporo.

Para aumentar a capacidade de germinação dos esporos, recomenda-se o pré-tratamento das amostras, que serve para eliminar as formas não esporuladas e quebrar a dormência dos esporos (CURRAN e EVANS, 1945; BEAMAN *et al.*, 1988). Geralmente emprega-se o uso de tratamento térmico, sendo a ativação também dependente da temperatura e tempo de exposição ao agente físico (calor), da composição do meio de cultivo e da temperatura de incubação (SCHIMDT, 1955; COOK e BROWN, 1964; FOESTER, 1983 e LOSICK, 1986).

A metodologia oficial para a contagem de células viáveis totais em IB autocontidos descrita na USP 29 (2006), recomenda o prévio tratamento das amostras em banho de água a 95°C-100°C por quinze minutos, seguido de rápido resfriamento a 0°C-4°C em banho de gelo. Entretanto: Hang *et al.* (2005), não

observaram alterações na germinação do *Bacillus cereus* após choque térmico até 70°C por 30 minutos, sendo inibida a 80°C; Molin e Svensson (1976) observaram que não houve diferença na contagem de esporos viáveis após o tratamento com água aquecida a 80° C por quinze minutos; Beaman *et al.* (1988), demonstraram que embora o choque térmico afete a permeabilidade e a resistência dos esporos, a presença de determinadas substâncias ativam a germinação, independente do tratamento térmico, pois, receptores específicos a determinados agentes nutricionais ou químicos, localizados na membrana interna do esporo, estariam envolvidos no processo germinativo.

Uma boa germinação depende de agentes iniciadores, que irão favorecer a interação germinante–receptor ocasionando uma movimentação iônica e a rehidratação parcial do esporo, seguida da hidrólise do córtex, permitindo então a hidratação total. A germinação em meio gelosado (ágar) é visível através da formação da colônia (SETLOW, 2007; MOIR, 2006) e em meio líquido pelo aumento da turvação ou densidade ótica (D.O.).

De maneira didática pode-se dividir a germinação dos esporos em quatro fases distintas: ativação, germinação, desenvolvimento (*outgrowth*) e crescimento das células vegetativas sobreviventes (ADAMS e BUSTA, 1972).

A ativação representa um processo responsável pela quebra da dormência nos esporos. O esporo está pronto para germinar, mas ainda retém a maior parte das propriedades de esporo ([http://www.fcf.usp.br/Departamentos/FBT/HP\\_Professores/Penna/Eventos/Libera%C3%A7%C3%A3oParam%C3%A9trica.pdf](http://www.fcf.usp.br/Departamentos/FBT/HP_Professores/Penna/Eventos/Libera%C3%A7%C3%A3oParam%C3%A9trica.pdf)

Durante a germinação, o esporo começa a ficar intumescido devido a absorção de água do meio. Com a rehidratação, o esporo perde a resistência e aumenta sua atividade metabólica. Nesta fase é importante que o meio de cultura contenha componentes nutritivos como açúcares, aminoácidos e nucleotídeos (MOIR, 2006). A seguir, inicia-se a liberação de dipicolinato de cálcio, juntamente com a penetração de água no interior do cerne (PAIDHUNGAT *et al.*, 2001; DE VRIES, 2004).

Este processo denominado de estágio I, leva menos de um minuto para ser efetivado em um esporo individualmente, porém o tempo é maior para uma população de esporos, pois indivíduos geralmente apresentam diferentes períodos de adaptação na fase lag, mesmo na presença de nutrientes e temperatura ideal de

crescimento do microorganismo (HASHIMOTO; FRIEBEN e CONTI, 1969). O metabolismo dos nutrientes endógenos e exógenos dos esporos não é iniciado na fase I da germinação. O aumento da quantidade de água no interior do cerne do esporo durante o estágio I da germinação, resulta em uma significativa redução da resistência térmica do esporo (Setlow, 2006).

No estágio II da germinação ocorre a ativação de enzimas líticas do córtex, particularmente pela liberação de ácido dipicolínico associado a cátions divalentes (PAIDHUNGAT *et al.*, 2001; SETLOW, 2006). Presume-se que a presença de inúmeras enzimas líticas seja uma garantia ao microorganismo de que a lise das paredes do córtex ocorrerá mesmo que algumas enzimas tenham sido destruídas ou não venham a ser ativadas. A lise desta membrana é importante, pois permite a completa hidratação do cerne, possibilitando o crescimento celular e conseqüente germinação do esporo, pois, ao contrário da esporulação, a germinação dos esporos necessita de água e de agentes iniciadores (SETLOW, 2006).

O processo de germinação pode ser incentivado pela presença de dipicolinato de cálcio, surfactantes catiônicos como a dodecilamino ou pressões muito altas (1-8 atm) (SETLOW, 2006). O dipicolinato de cálcio e outros nutrientes germinantes ativam a germinação dos esporos por vias independentes (PAINDHUNGAT *et al.*, 2000).

Após a germinação, o metabolismo normal é retomado e há síntese dos constituintes de uma célula vegetativa, ocorrendo o crescimento celular (FIGURA 9).



FIGURA 9: GERMINAÇÃO DE ESPORO BACTERIANO

FONTE: [Http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia3/morfologia3.html](http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia3/morfologia3.html)

### 3.6 MEIO DE GERMINAÇÃO

Schmidt (1955) já relatava a importância da habilidade do meio de cultura em favorecer a germinação dos esporos bacterianos seguida da multiplicação das células vegetativas formadas, principalmente se estes sofreram danos pela ação do calor.

Esporos danificados exigem uma demanda maior de nutrientes para sua germinação do que os não tratados pelo calor. Portanto, a recuperação de esporos danificados, requer características peculiares do meio de cultura, pois pode afetar significativamente a determinação da termorresistência da população (YORK E NELSON, 1942; SCHMIDT, 1955; PFLUG, 1981; YOKOYA, MALLIDIS e SCHOLEFIEL, 1986; BROWN, 1988).

As substâncias requeridas para a recuperação do esporo danificado variam de acordo com a espécie do microorganismo, a natureza do agente letal e a extensão do dano causado. Os esporos sobreviventes, porém danificados perdem rapidamente sua viabilidade quando não expostos a condições favoráveis (SCHMIDT, 1955).

A recuperação dos esporos danificados durante o processo de esterilização, tem sido largamente estudada. Segundo Okelo (2003), a germinação dos esporos sobreviventes serve tanto para avaliar a eficácia do procedimento como para determinar a termorresistência dos esporos utilizados como IB.

Sabendo-se da maior dificuldade de germinação dos esporos danificados quando submetidos a condições fortemente adversas, o emprego de meios de cultura particularmente ricos em substâncias nutritivas capazes de fornecer condições de recuperação destes esporos sobreviventes deve ser minuciosamente estudado.

A formulação adequada do meio de recuperação dos esporos deve ser observada, pois alguns constituintes podem ser fatores inibitórios quando presentes em concentrações inadequadas (BROWN e GAZE, 1988).

Para a quantificação dos esporos sobreviventes à esterilização pelo calor úmido vários meios têm sido recomendados como: DTA (*Dextrose tryptone agar*) citado por Campbel *et al.* (1965); o AAM (*Antibiotic Assay Médium*), estudado por Cook e Gilbert (1968) e Navani *et al.* (1970); o TPDP (*Trypticase Phytone Dextrose*

*Potassium phosphate Agar*) recomendado por Labbe (1979) e TSA (*Trypticase Soy Agar*) indicado por Mikolajacik e Rajkowski (1980) e pela USP 29 (2006).

Alguns autores têm relatado que o valor de D (tempo de termodestruição) depende do meio de recuperação. Diferentes marcas de um mesmo meio podem possuir diferenças na capacidade de recuperação dos esporos danificados (PFLUG *et al.*, 1981; ZECHMAN e PFLUG, 1991; SASAKI *et al.*, 2000 e SHINTANI *et al.*, 2000). Shintani *et al.* (2000) mencionaram ainda diferenças encontradas em lotes distintos de uma mesma marca.

A farmacopéia americana na sua 29ª edição (2006) recomenda como meio para o cultivo dos esporos presentes nos IB, o *soybean casein digest* na forma de caldo para recuperar os esporos danificados pelo calor e na forma de ágar para a quantificação dos esporos íntegros, não mencionando marcas.

Cazemier *et al.* (2001), realizaram experimentos quantificando esporos danificados pelo calor do *Bacillus subtilis* A163, em ágar de soja tripticaseína (TSA) e TSA acrescido de cloreto de sódio. Perceberam que a presença de concentração acima de 4% (p/p) de cloreto de sódio diminuiu a quantidade de esporos recuperados devido ao stress osmótico provocado pela presença do sal, mas a adição de prolina e cloreto de potássio melhoraram a recuperação.

Estudos verificaram que um indicador biológico padronizado quanto à quantidade e resistência dos esporos com determinado meio de cultivo, pode ter a germinação de seus esporos, após dano pelo calor, alterada com o uso de diferentes marcas ou mesmo lote do mesmo meio de cultivo (BROWN, 1988; PFLUG, 1981; ZECHMAN e PFLUG, 1991).

Um IB de primeira geração (que não vem acompanhado do meio para a germinação dos esporos avariados) pode fornecer um resultado diferente do padronizado quanto à termorresistência dos esporos, se esta foi determinada sob condições diferentes das que o usuário irá utilizar.

Alguns autores citam que o púrpura de bromocresol pode ser um fator inibitório à germinação dos esporos (COOK e GILBERT, 1968; COOK e BROWN, 1960; BROWN, 1988). Zechman e Pflug (1991) consideraram que a adição de 0,004% (p/V) de púrpura de bromocresol nos meios estudados para a recuperação de esporos danificados pelo calor contribuiu para o decréscimo das contagens dos microorganismos sobreviventes. Penna (2000) observou que pequenas quantidades do mesmo não interferiram na recuperação dos esporos



avariados. Smith *et al.* (1981) descreveram estudos realizados para a quantificação de esporos danificados pelo calor, provenientes de IB comerciais usando o TSB e TSB acrescido de 0,0015g% de púrpura de bromocresol, não observando diferenças significativas nos resultados com os dois meios.

Sasaki *et al.* (2000) realizaram um estudo com diversos meios de cultura oriundos de diferentes fabricantes e perceberam que a concentração de cálcio existente nas formulações era o fator que determinava a alteração no valor de D dos esporos testados. Penna *et al.* (2000) também observaram que a presença de cálcio no meio de cultura afeta a resistência e a germinação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953. Lopez *et al.* (1997) recomendam o emprego de 100 ppm (0,01g%) de cálcio no meio de germinação enquanto Penna *et al.* (2000) recomendam as concentrações de 0,001 g% a 0,05 g%.

Setlow (2007) explica que a presença do cloreto de cálcio no meio de cultivo favorece a germinação dos esporos danificados, pois, induz a formação das SASP (proteínas ácido resistentes), que têm papel importante na regeneração do DNA das células agredidas.

Certos açúcares, principalmente glucose, são efetivos na germinação de esporos, por seu sinergismo com determinados amino ácidos e cátions, principalmente potássio (LEVINSON e HYATT, 1966).

Recomenda-se como faixa de pH ótima para a recuperação dos esporos em torno de 7,0 – 7,3 (COOK e BROWN, 1965; YOKOYA e YORK, 1965; COOK and GILBERT, 1968; MALLIDIS e SCHOLEFIELD, 1986; FEEHERRY *et al.*, 1987). Worden (1991) verificou crescimento intensivo de bacilos em pH de 6,0 a 8,0, e pouco crescimento em pH 5,5. López *et al.* (1997) cita a obtenção máxima de contagem de colônias em pH 7,0. Yokoya (1965), percebeu que os esporos do *Geobacillus stearothermophilus* submetidos a tratamento térmico não apresentaram crescimento em pH 6,0, porém em pH 7,0 houve bom desenvolvimento.

Schmidt (1955) observou que a presença de pequenas quantidades de ácidos graxos insaturados não inibiu o crescimento de células vegetativas, porém interferiram na germinação de esporos.

A presença de amido solúvel na concentração de 0,1% (peso/volume) na composição do meio aumenta a sua capacidade germinativa, pois o amido solúvel favorece a adsorção de substâncias inibidoras da germinação do esporo danificado pela ação do calor, como ácidos graxos livres (BROWN e GAZE, 1988; ZECHMAN e

PFLUG, 1991; LOPEZ *et al.* 1997; LABBE, 1979; COOK e BROWN, 1965; PENNA, 2000; MALLIDIS e SCHOLEFIEL, 1986; COOK e GILBERT, 1968). Schimidt (1955) relatou que a presença de carvão ativo e albumina sérica no meio de cultivo desempenharam papel semelhante ao amido solúvel.

### 3.7 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Com o desenvolvimento da produção de álcool a partir da cana-de-açúcar, a indústria alcooleira vem minimizando o impacto ambiental provocado pelos combustíveis fósseis. Porém, o processamento da cana-de-açúcar para a produção do álcool combustível gera uma quantidade enorme de resíduos, principalmente o bagaço da cana e a vinhaça ou vinhoto. Estes resíduos também são poluentes e diversas frentes de pesquisas vêm sendo desenvolvidas para empregá-los como matéria prima em outros processos.

Outro resíduo gerado pela agroindústria é o melaço da soja que é um co-produto gerado na produção do concentrado protéico de soja obtido pela extração dos açúcares do óleo de soja, usando uma mistura de água e etanol como solvente (SIQUEIRA, 2008; AYUB, 2002). A vinhaça de soja é gerada após a fermentação do melaço de soja para a obtenção de etanol (FIGURA 10).

A grande maioria dos estudos enfoca o emprego destes resíduos na agropecuária, seja na forma de adubo ou como complemento nas rações alimentares de animais. Avanços têm sido obtidos dentro da biotecnologia empregando tais resíduos ou subprodutos como substratos no cultivo de microorganismos que possam produzir enzimas, antibióticos, ácidos de interesse (ex. ácido cítrico) ou outro produto fruto das vias metabólicas de fungos, leveduras ou bactérias estudados.

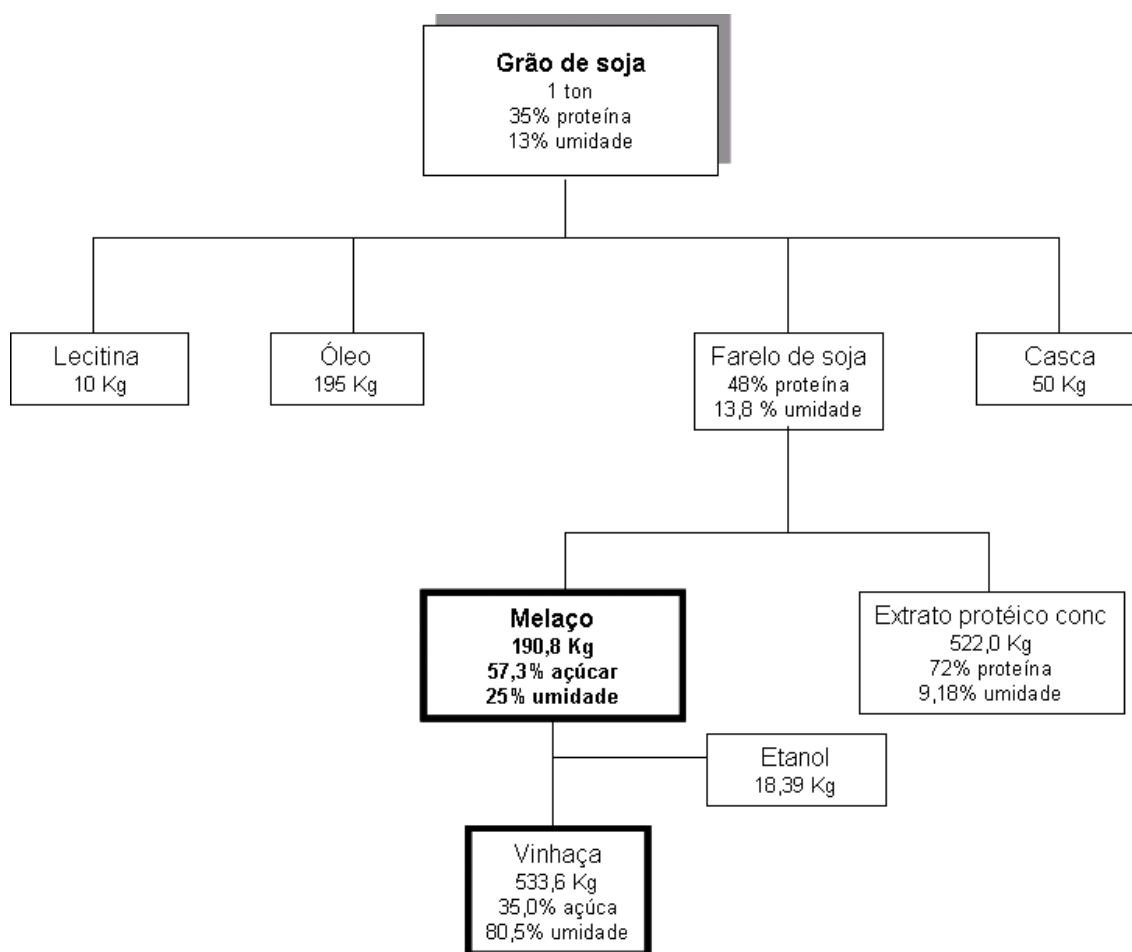


FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO BENEFICIAMENTO DOS GRÃOS DE SOJA, OBTENDO COMO CO-PRODUTO O MELAÇO E COMO RESÍDUO A VINHAÇA  
FONTE: SIQUEIRA (2008)

Siqueira (2008) determinou a composição do melaço de soja em três diferentes amostras e obteve os resultados constantes da TABELA 1. A vinhaça de soja possui oligossacarídeos, além de proteína da soja e lipídeos em sua composição.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MELAÇO DE SOJA

| Componente          | % em base seca | Desvio padrão |
|---------------------|----------------|---------------|
| Glucose             | 0,24           | 0,06860       |
| Frutose             | 0,13           | 0,06576       |
| galactose           | 0,25           | 0,03250       |
| Sucrose             | 28,40          | 2,069         |
| Galactose           | --             | --            |
| Rafinose            | 9,68           | 1,287         |
| Estaquiose          | 18,60          | 2,828         |
| Carboidratos totais | 57,30          | 1,381         |
| Proteína            | 9,44           | 1,160         |
| lipídios            | 21,20          | 2,680         |
| Fibras              | 5,70           | 2,675         |
| cinzas              | 6,36           | 1,387         |

FONTE: SIQUEIRA (2008)

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto proveniente da concentração do caldo de cana na produção de açúcar cristalizado. É constituído principalmente de açúcares assimiláveis e outros de cadeia orgânica mais complexas de difícil degradação que necessitam de maior tempo e enzimas. Os açúcares assimiláveis são a frutose, sacarose e maltose (açúcares fermentáveis). A caracterização físico-química do melaço está discriminada na TABELA 2.

TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

| Componente                      | mínimo | média | máximo | média |
|---------------------------------|--------|-------|--------|-------|
| Peso específico                 | 1,4    | 1,4   | 1,4    | 1,4   |
| pH (diluição 2:1)               | 4,5    | 5,5   | 6,0    | 5,3   |
| Água %                          | 16,0   | 19,0  | 23,0   | 19,3  |
| Substância seca %               | 77,0   | 81,0  | 84,0   | 80,7  |
| N-total %                       | 0,4    | 0,7   | 1,5    | 0,9   |
| Cinza %                         | 7,0    | 9,0   | 11,0   | 9,0   |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> % | 0,6    | 0,9   | 2,0    | 1,2   |
| CaO %                           | 0,1    | 0,5   | 1,1    | 0,6   |
| MgO %                           | 0,03   | 0,07  | 0,1    | 0,07  |
| K <sub>2</sub> O %              | 2,6    | 3,6   | 5,0    | 3,7   |

Fonte: Alltech Biotecnologia do Paraná

Oligossacarídeo por definição é um composto constituído por um pequeno número de unidades monossacarídicas (de 2 até aproximadamente 10) (STANEK *et al.*, 1965; PAOLETTI & JOHNSON, 1995). Esses compostos podem ser naturalmente encontrados em sistemas biológicos como produtos de seu metabolismo normal podendo exercer diversas funções. Em vegetais, podem servir principalmente como compostos de reserva ou como osmorreguladores, sendo a sacarose o oligossacarídeo de maior ocorrência em plantas (CROWE *et al.*, 1987).

A vinhaça e o melaço da soja possuem oligossacarídeos de rafinose (RO), principalmente rafinose e estaquiose, que possuem em sua estrutura unidades de galactose unidas por ligações  $\alpha$  (1-6) (SOUZA, 2006; ESKIN *et al.*, 1989; MAITY; PAUL, 1991; RUIZ *et al.*; MULIMANI; RAMALINGAN 1997).

A estaquiose é um tetrassacarídeo composto por duas moléculas de galactose, uma de glicose e uma de frutose. A rafinose é um trissacarídeo composto por uma molécula de galactose, uma de glicose e uma de frutose (FIGURA 11).

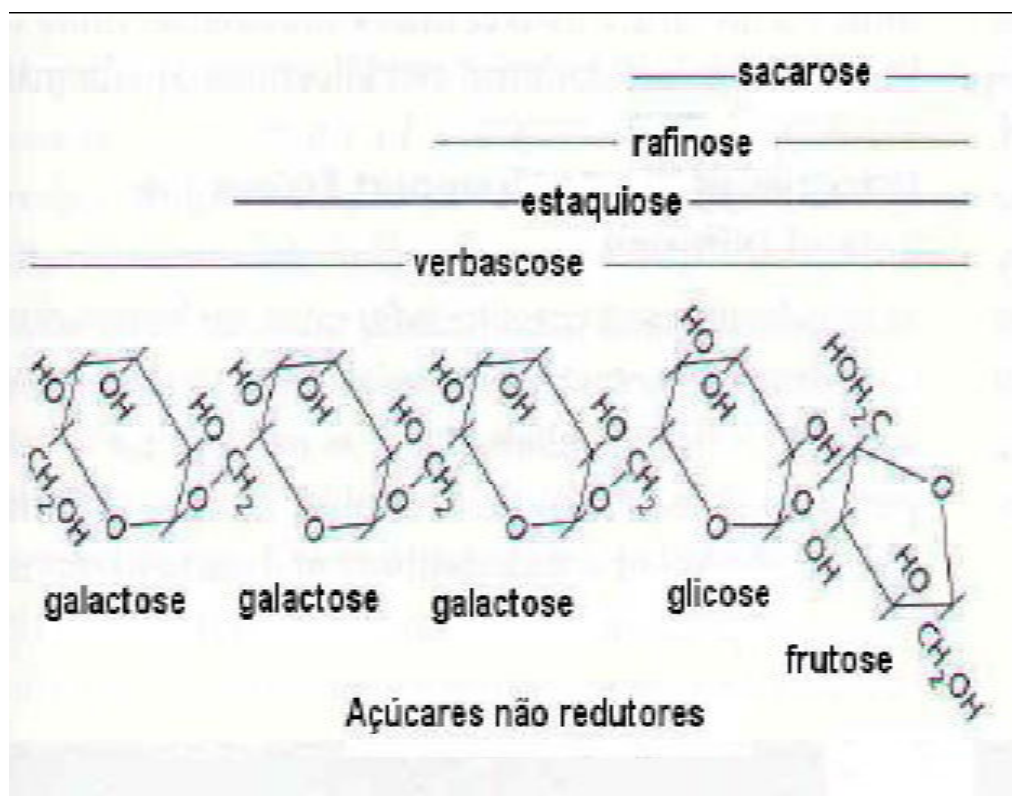


FIGURA 11 – COMPOSIÇÃO DOS AÇÚCARES DA VINHAÇA E MELAÇO DE SOJA

FONTE: <http://felix.ib.usp.br/pessoal/marcos/minhawe3/Docs%20aulas%20teoricas/Transporte%20n%20floema.pdf>

### 3.8 USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO MEIO DE CULTIVO PARA BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* sp

Alguns microorganismos, principalmente bactérias do gênero *Bacillus*, são empregados como agentes despoluentes de águas contaminadas, pela sua capacidade em degradar de maneira eficiente a matéria orgânica solúvel presente em águas residuais, diminuindo desta maneira os níveis de DBO (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio). Os microorganismos do gênero *Bacillus* se desenvolvem em meios que contenham açúcares, ácidos orgânicos, ácidos graxos entre outros como fontes de carbono e amônia como fonte de nitrogênio. Estes microorganismos possuem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam polissacarídeos, ácidos nucléicos e hidrocarbonetos lipídicos, os quais são utilizados pelas bactérias como fonte de carbono e doadores de elétrons. Produzem também agentes que inibem ou matam outras espécies diferentes ou cepas diferentes dentro da mesma espécie, são as

chamadas bacteriocinas, diferentes dos antibióticos, pois tem um espectro de atividade mais amplo. Os produtos finais da atividade microbiana são dióxido de carbono, água e principalmente biomassa (AliBio WA).

Porte *et al.* (1992) observou a capacidade que o *Bacillus stearothermophilus* possui de produzir a glicoproteína  $\alpha$ -galactosidase, que é estável a temperatura de 65-70°C. A enzima  $\alpha$ -galactosidase, também conhecida como melibiose hidrolase ou  $\alpha$ -D-galactosídeo galactohidrolase, catalisa ligações  $\alpha$  (1-6) galactosídicas, liberando  $\alpha$ -D- galactose. Estas ligações são encontradas em oligossacarídeos como a melibiose, rafinose e a estaquiose (ESKIN *et al.*, 1989; MAITY; PAUL, 1991; RUIZ *et al.*; MULIMANI; RAMALINGAN, 1997). Estes carboidratos estão presentes nos resíduos da indústria de beneficiamento da soja.

Kubo *et al.* (1993) isolou uma cepa de *Bacillus stearothermophilus* HA19 com capacidade de degradar resíduos de soja, secretando grandes quantidades de proteases termoestáveis no meio.

### 3.9 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A fermentação no estado sólido (FES) pode ser definida como o processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte). O conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI *et al.*, 2001).

A fermentação no estado sólido apresenta algumas vantagens sobre a fermentação submersa: normalmente é um processo simples, de baixo capital de investimento, pouco consumo de energia e fácil controle de contaminação devido ao baixo nível de umidade no sistema. Uma outra vantagem é o uso de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade, tais como os resíduos da agroindústria (torta de soja, bagaço de cana, farelo de trigo, farelo de arroz) (SOCCOL *et al.*, 2003).

Entretanto, este processo tem algumas limitações, entre elas uma limitada variedade de microrganismos capazes de crescer em níveis de umidade reduzida. A maioria dos trabalhos em fermentação no estado sólido encontrados na literatura utiliza fungos filamentosos, uma vez que um grande número de espécies destes

microrganismos cresce bem em condições de umidade reduzida (GERMANO et al., 2003). Entretanto, tentativas de produzir enzimas usando bactérias por fermentação no estado sólido têm sido feitas com algum sucesso (PANDEY et al., 2000).

## 4.0 MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma dos ensaios realizados encontram-se na FIGURA 12.

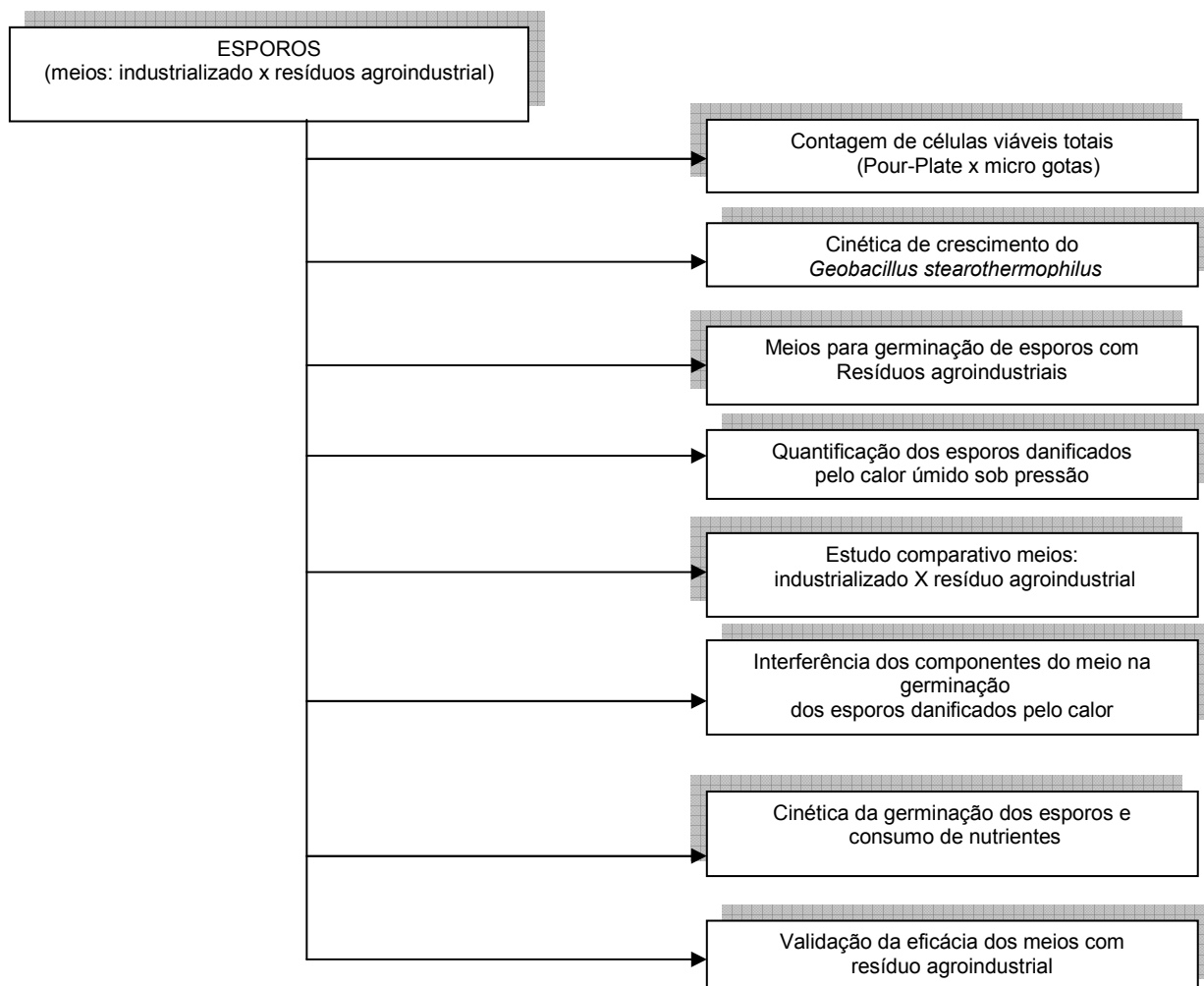


FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS REALIZADOS

### 4.1 PRODUÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO AQUOSA CONCENTRADA DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

A obtenção da suspensão aquosa de esporos seguiu o padronizado no Procedimento Operacional Padrão - POP 14.00.02 (Procedimento para a produção e padronização do concentrado de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953) do Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos – CPPI.



#### 4.1.1 Microorganismo

Os estudos foram realizados utilizando-se a cepa padrão do *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953, Lote 0400144, fornecida liofilizada pelo INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

#### 4.1.2 Recuperação e manutenção da cepa padrão

A recuperação da cepa iniciou-se com a suspensão do liofilizado em 1,0 mL de água destilada estéril e posterior repique com o auxílio de alça de platina, em tubos de ensaio contendo 20,0 mL de TSA (*trypticase soybean ágar*- ágar de soja tripticaséina), inclinado. Os tubos foram incubados a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e posteriormente, mantidos sob refrigeração entre  $4^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ , sofrendo repiques de manutenção a cada 6 meses. Após o quinto repique, nova cepa é recuperada e as antigas são devidamente descontaminadas e eliminadas.

Suspensões aquosas de esporos padronizadas quanto à termorresistência, são mantidas congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e em nitrogênio líquido, para serem utilizadas como semente.

#### 4.1.3 Produção das suspensões aquosas concentradas de esporos

Partindo-se das cepas reidratadas, foram produzidas as suspensões aquosas de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, sendo mantidas sob refrigeração com temperatura entre  $4^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ .

O procedimento para obtenção da suspensão aquosa de esporos, passou por cinco etapas distintas. Sendo as três primeiras, repiques consecutivos para ativação e multiplicação da cepa. A quarta etapa foi a esporulação propriamente dita e a quinta etapa foi a padronização da suspensão aquosa de esporos obtida.

O fluxograma para a obtenção da suspensão aquosa concentrada de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 encontra-se na FIGURA 13.

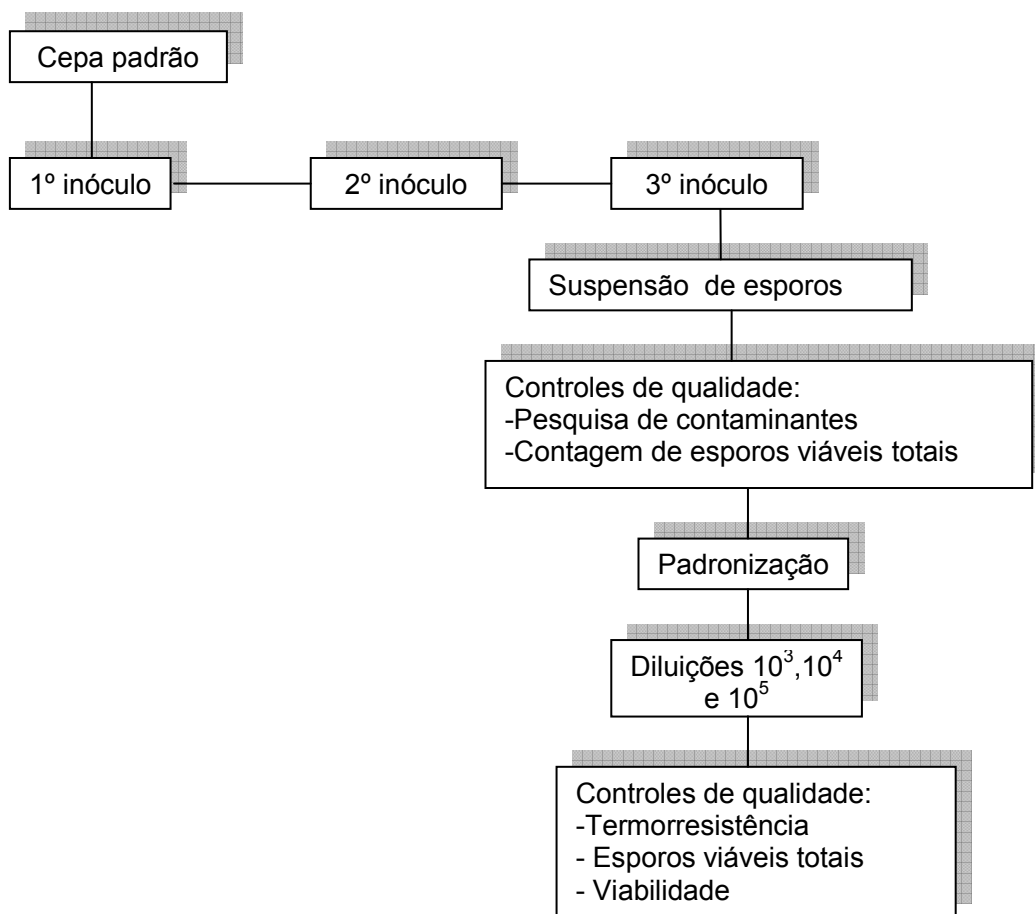


FIGURA 13 - FLUXOGRAMA PARA A OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO AQUOSA CONCENTRADA DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

#### 4.1.3.1 Repiques

##### 4.1.3.1.1 Primeiro repique

A partir de um dos tubos de TSA com a cepa rehidratada, fez-se um repique para ativação em 30,0 mL de TSB (*trypticase soy broth*-caldo de soja tripticaseína). Incubou-se por 24 horas em estufa a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.1.3.1.2 Segundo repique

Inoculou-se 1,0 mL do crescimento microbiano obtido no primeiro repique em novo tubo de ensaio contendo 30,0 mL de TSB. O tubo foi incubado por 18 horas a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.3.1.3 Terceiro repique / esporulação

##### a) Meios com resíduos agroindustriais

Foram realizados ensaios para a obtenção de esporos termorresistentes por fermentação no estado sólido (FES), utilizando resíduo da agroindústria (bagaço de cana-de-açúcar e casca de soja) como substrato.

- Bagaço de cana-de-açúcar

Foram realizadas fermentações utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar como suporte, acrescido de nutrientes e sais estimuladores da esporulação, conforme formulação descrita na TABELA 3. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, fechados com papel alumínio e parafilm, onde foram adicionados 5g de bagaço de cana-de-açúcar e os demais componentes em quantidade suficiente para obter 83-85% de umidade (absorção máxima do bagaço de cana). O pH dos meios foram ajustados para  $7,8 \pm 0,1$  antes da autoclavação, pois os resíduos agroindustriais testados tendem a acidificar o meio quando submetidos ao processo de esterilização. O meio padrão teve o pH ajustado para  $7,2 \pm 0,1$ . Os meios foram autoclavados por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}/1 \text{ atm}$

TABELA 3 – SUBSTRATOS DOS MEIOS PARA FES COM BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE

| <b>Componentes<br/>g%</b>      | <b>Meio 1</b> | <b>Meio 2</b> | <b>Meio 3</b> | <b>Meio 4</b> | <b>Meio 5<br/>(controle)</b> |
|--------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------|
| Peptona de caseína             | 0,3           | ---           | ---           | ---           | 0,3                          |
| Triptona                       | 0,5           | ---           | ---           | ---           | 0,5                          |
| Extrato de carne               | 0,3           | ---           | ---           | ---           | 0,3                          |
| Extrato de levedura            | 0,5           | ---           | ---           | ---           | 0,5                          |
| Sulfato de manganês            | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005                        |
| Sulfato de magnésio            | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005                        |
| Cloreto de cálcio              | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005                        |
| Fosfato diácido de potássio    | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005         | 0,005                        |
| Melaço de soja                 | ---           | ---           | 2,0           | 1,0           | ---                          |
| Tampão fosfato 7,6 (qsp)<br>mL | 100,0         | 100,0         | 100,0         | 100,0         | ---                          |
| Ágar                           | ---           | ---           | ---           | ---           | 2,0                          |

NOTA: q.s.p – quantidade suficiente para

FONTE: O Autor (2006)

- Casca de soja

Foram realizados estudos aplicando a casca da soja como suporte para a fermentação no estado sólido, sendo utilizadas as formulações dos meios constantes na TABELA 4. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer com 250 mL de capacidade, sendo adicionados 5g de casca de soja e os demais constituintes em quantidade suficiente para obter 88 % de umidade (absorção máxima da casca de soja).

TABELA 4 – SUBSTRATOS DOS MEIOS PARA ESPORULAÇÃO COM CASCA DE SOJA COMO SUPORTE

| Componentes (g%)               | Meio 1 | Meio 2 | Meio 3 | Meio 4 | Meio 5<br>(controle) |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|----------------------|
| Peptona de caseína             | ---    | 0,3    | ---    | ---    | 0,3                  |
| Triptona                       | ---    | 0,5    | ---    | ---    | 0,5                  |
| Extrato de carne               | ---    | 0,3    | ---    | ---    | 0,3                  |
| Extrato de levedura            | ---    | 0,5    | ---    | ---    | 0,5                  |
| Sulfato de manganês            | 0,005  | 0,005  | ---    | ---    | 0,005                |
| Sulfato de magnésio            | 0,005  | 0,005  | ---    | ---    | 0,005                |
| Cloreto de cálcio              | 0,005  | 0,005  | ---    | ---    | 0,005                |
| Fosfato diácido de potássio    | 0,005  | 0,005  | ---    | ---    | 0,005                |
| Melaço de soja                 | ---    | ---    | ---    | 1,0    | ---                  |
| Agar bacteriológico            | ---    | ---    | ---    | ---    | 2,0                  |
| Tampão fosfato 7,6 (qsp)<br>mL | 100,0  | 100,0  | 100,0  | 100,0  | ---                  |

FONTE: O Autor (2006)

O inóculo para os dois resíduos foi de 1%, partindo-se do tubo com o segundo repique (item 4.1.3.1.2), aproximadamente  $6,4 \times 10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> de substrato.

Os frascos foram incubados a  $57,5 \pm 2,5$  °C, durante 14 dias, sendo retiradas amostras no 7º, 10º e 14º dia. Foram preparadas lâminas coradas pelo método de Gram, para acompanhamento da esporulação.

A separação dos esporos do substrato foi realizada adicionando-se 100 mL de solução 0,01% de tween 80, gelada e estéril. Em seguida os frascos foram agitados em shaker por 60 minutos a 250 rpm a 4°C. Sendo filtrado posteriormente em funil com touca em TNT (tecido não tecido), gaze e algodão, o filtrado foi centrifugado três vezes a 2500 rpm/20 minutos a 4°C. A recuperação do sedimento em cada centrifugação foi realizada com água destilada estéril gelada. O sedimento final foi resuspenso em 50 mL de água destilada estéril e submetido a vapor fluente por 5 minutos.

O preparo dos meios, inóculo e recuperação dos esporos foram realizados em fluxo laminar classe 100 e sob condições assépticas.

O meio para esporulação padronizado no CPPI foi utilizado como controle (PARANÁ, 2005).

#### b) Meio industrializado

Para a indução à esporulação, utilizou-se um meio de cultura descrito por Sella, 1995: peptona de caseína, 0,3g%; triptona, 0,5g%; extrato de carne, 0,3g%; extrato de leveduras, 0,5g%; sulfato de manganês, 0,005g%; sulfato de magnésio, 0,005g%; cloreto de cálcio, 0,005g%; fosfato diácido de potássio, 0,005g% e ágar bacteriológico, 2,0g%. O pH foi ajustado para  $7,2 \pm 0,1$  com soluções 0,1N de NaOH e HCl conforme a necessidade.

O meio foi acondicionado em quatro garrafas de Roux num volume de 400,0 mL/unidade, fechadas com tampão de gaze e algodão, sendo autoclavadas por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}/1\text{atm}$ .

Foram inoculados 2,0 mL do crescimento microbiano do segundo repique em cada uma das garrafas de Roux. Foram feitos movimentos com a garrafa para possibilitar a inoculação em toda a superfície do ágar. As garrafas inoculadas foram incubadas a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  (FIGURA 14). A partir do sétimo dia de incubação, o grau de esporulação foi acompanhado por microscopia em lâminas coradas pelo método de gram.



FIGURA 14 – INDUÇÃO À ESPORULAÇÃO DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM MEIO DE CULTURA GELEIFICADO  
FONTE: O Autor (2007)

#### 4.1.3.2 Recuperação dos esporos

Os esporos foram retirados da superfície do ágar com o auxílio de bastão de vidro e 80,0 mL de água destilada estéril gelada (FIGURA 14). A suspensão foi filtrada através de gaze e algodão (FIGURA 15) e centrifugada a 2500 rpm em centrífuga refrigerada marca FANEN FR22, a 4°C por 20 minutos. Após, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com 50,0 mL de água destilada estéril gelada para ser novamente centrifugado. As centrifugações foram repetidas por três vezes. A recuperação final ocorreu com água destilada estéril gelada, guardando-se a proporção de 50,0 mL para cada garrafa de Roux incubada.

A suspensão de esporos foi homogeneizada em agitador magnético, fracionada em frascos-ampola num volume de 5,0 mL por frasco. Sendo imediatamente submetidos a 5 minutos de vapor fluente a 100°C em autoclave vertical gravitacional, marca Fabbe-Primar, para eliminação das formas vegetativas.

Todo o processo de repiques, lavagem e recuperação dos esporos foram realizados em condições assépticas e sob fluxo laminar classe 100.

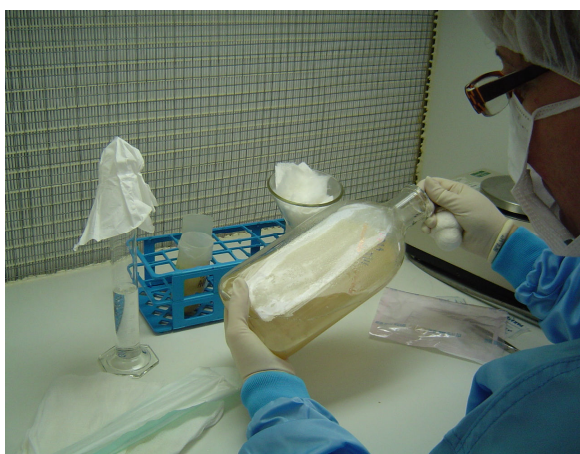


FIGURA 15 – RETIRADA DOS ESPOROS DA SUPERFÍCIE DO ÁGAR  
FONTE: O Autor (2007)

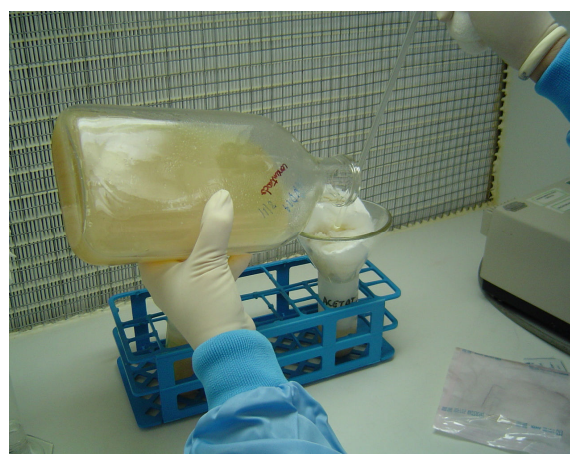


FIGURA 16 – FILTRAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS  
FONTE: O Autor (2007)

#### 4.1.3.3 Controle de qualidade das suspensões aquosas de esporos

Os controles de qualidade foram realizados pela contagem das células viáveis totais, pesquisa de contaminantes, verificação da viabilidade e determinação

da concentração necessária para obtenção da termorresistência recomendada para a produção de IB, aplicando-se as metodologias recomendadas pela USP 29 (2006).

#### 4.1.3.3.1 Contagem de células viáveis totais

A contagem de células viáveis foi realizada pelo método do ágar fundido ou pour-plate, após diluição seriada decimal em água destilada estéril, 1,0 mL de cada diluição foi inoculado em placa de Petri de vidro, sendo imediatamente vertidos 30,0 mL de TSA fundido ( $\pm 50^{\circ}\text{C}$ ). Foram realizados movimentos circulares para completa homogeneização e as placas foram mantidas no interior do fluxo laminar até o endurecimento do ágar, sendo imediatamente incubadas invertidas por 48 horas a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ .

A contagem das colônias formadas pelos esporos viáveis foram realizadas com o auxílio de contador de colônias marca Phoenix CP 600, considerando-se os valores encontrados entre 30 e 300 colônias formadas. Foi realizada em duplicata, sendo utilizada a média das duas placas multiplicada pelo fator de diluição e o resultado foi fornecido em UFC.  $\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.1.3.3.2 Pesquisa de contaminantes

Foram inoculados 1,0 mL da suspensão de esporos em teste em placa de Petri de vidro estéril, com posterior adição de 30,0 mL de Ágar *Saboraund* fundido e incubação a  $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  por 7 dias, para a pesquisa de bolores e leveduras. O mesmo procedimento foi realizado para a pesquisa de bactérias, porém o meio utilizado foi o TSA e a incubação ocorreu a  $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

#### 4.1.3.3.3 Padronização das suspensões aquosas de esporos

A padronização foi realizada com a intenção de determinar a concentração de esporos suficiente para fornecer a termorresistência necessária à produção de IB.

Foram realizados testes de contagem de células viáveis totais, averiguação da viabilidade e determinação da termorresistência para a obtenção dos valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  (tempo de termodestruição ou tempo de redução decimal) e  $U_{\text{SK}}$  (tempo médio

de morte), sendo aplicadas as metodologias recomendadas pela USP (2006) para a produção de indicadores biológicos para calor úmido autocontidos.

#### a) Preparo das amostras

Para a determinação da resistência térmica ( $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{\text{SK}}$ ), utilizou-se o meio padronizado para germinação de esporos, empregado pelo CPPI (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos), na produção do Indicador Biológico (IB)-Esteriteste, cuja composição é: caldo de soja tripticaseína -TSB, 0,3g%; cloreto de cálcio, 0,018g%; amido solúvel, 0,1g%; púrpura de bromocresol, 0,001g% e água destilada q.s.p.100 mL. O pH foi ajustado para  $6,8 \pm 0,1$  com soluções 0,1N de NaOH e HCl. Foram preparados três frascos com 300,0 mL cada, deste meio nutritivo para germinação de esporos. O meio foi autoclavado por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}/1\text{atm}$ , em frasco fechado por tampão de gaze e algodão.

Partindo-se dos resultados obtidos na determinação de células viáveis totais, realizou-se a diluição da suspensão de esporos em teste, para a obtenção de aproximadamente  $5,0 \times 10^3 \text{ UFC.3mL}^{-1}$ ,  $5,0 \times 10^4 \text{ UFC.3mL}^{-1}$  e  $5,0 \times 10^5 \text{ UFC.3mL}^{-1}$ , inoculou-se o volume calculado em cada frasco do meio germinativo.

Após a inoculação dos esporos, as suspensões foram agitadas por 15 minutos, em agitador magnético, com o auxílio de barra de imã e o meio de cultivo com esporos suspensos foi fracionado em alíquotas de 3,0 mL em frascos-ampola (FIGURA 17), fechados com rolhas de borracha siliconadas e selados com lacres de alumínio (FIGURA 18). Foram produzidos 100 frascos-ampola para cada diluição.





FIGURA 17 – ENVASE DAS AMOSTRAS COM OS MEIOS TESTADOS SOB CONDIÇÕES ASSÉPTICAS  
FONTE: O Autor (2007)



FIGURA 18 – SELAGEM DOS FRASCOS COM LACRES DE ALUMÍNIO  
FONTE: O Autor (2007)

#### b) Viabilidade

Foram incubados 10 frascos-ampola de cada concentração ( $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$ ) em estufa com circulação de ar a  $57,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$ . Leituras foram realizadas em 24 e 48 horas.

#### c) Contagem de células viáveis totais

A determinação do número de  $\text{UFC.mL}^{-1}$  foi realizado para cada concentração ( $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$ ) conforme o item 4.1.3.3.1.

#### d) Termorresistência

Dez frascos-ampola de cada concentração de esporos foram expostos às mesmas condições de temperatura e pressão ( $121^\circ\text{C}/1\text{atm}$ ), porém com tempos diferentes de autoclavação. Foram usados seis tempos: 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 e 17,5 minutos (FIGURAS 19 e 21 ).

Para este teste foi utilizada uma autoclave gravitacional vertical marca Fabbe-Primar (FIGURA 20). Após o término de cada tempo de autoclavação, a autoclave foi rapidamente despressurizada e aberta para a troca das amostras.

O cultivo foi realizado em estufa com circulação de ar, marca Logen, com temperatura de  $57,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ . As leituras foram realizadas após 24 e 48 horas de incubação.



FIGURA 19 – AMOSTRA DE FRASCOS COM MEIO SEPARADO EM GRUPOS DE 10 UNIDADES PARA A REALIZAÇÃO DA TERMORRESISTÊNCIA

FONTE: O autor (2007)



FIGURA 20 – AUTOCLAVE FABBE-PRIMAR

FONTE: O autor (2007)



FIGURA 21 – FRASCOS NO INTERIOR DA AUTOCLAVE

FONTE: O autor (2007)

#### e) Cálculos de $U_{SK}$ e $D_{121^{\circ}\text{C}}$

Foram determinados pelo Método da Fração negativa – Spearman-Käber, conforme recomendação da USP 29, 2006 para IB autocontidos.

#### 4.2 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A METODOLOGIA OFICIAL E O MÉTODO DA MICRO-GOTA OU SEMEADURA EM SUPERFÍCIE PARA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (POUR-PLATE)

Foram avaliados seis lotes de suspensão aquosa de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, produzidas e padronizadas pelo CPPI, cinco lotes de IB Esteriteste-CPPI e dois lotes de IB autocontido Sterikon-Merck.

As diluições seriadas decimais das amostras foram realizadas em frascos-ampola contendo 4,5 mL de água destilada estéril, sendo o inóculo inicial de 0,5 mL para cada amostra. Sucessivamente foram sendo transferidos 0,5 mL de cada diluição para o frasco seguinte, após serem homogeneizados em agitador tipo vórtex, por um minuto.

No método pour-plate, inoculou-se 1,0 mL de cada diluição das amostras /placa, vertendo-se logo em seguida 30,0 mL de TSA liquefeito numa temperatura aproximada de 50°C. Foram realizados movimentos circulares suaves para completa homogeneização. Com as placas tampadas e no interior da cabine de fluxo laminar, esperou-se o completo resfriamento e solidificação do meio para incubá-las invertidas por 48 horas, a 57,5°C  $\pm$  2,5°C.

Para o método de inoculação de micro gotas na superfície do ágar, as placas contendo 30,0 mL de TSA já solidificado, foram divididas em quatro com caneta de retroprojeto. Com o auxílio de micropipeta, foram inoculados 50 µL/diluição/quadrante. As placas inoculadas permaneceram na cabine de fluxo laminar, em temperatura ambiente, semi abertas (protegidas pelo fluxo de ar filtrado) até que suas superfícies estivessem totalmente secas. A incubação ocorreu com as placas viradas para cima, a uma temperatura de 57,5°C  $\pm$  2,5°C, sendo realizadas leituras com 24 horas e 48 horas.

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram obtidos pela média das duas contagens, considerando-se as diluições que apresentaram entre 30 e 300 colônias. As diluições seriadas e as inoculações nas placas foram realizadas sob condições assépticas e em cabine de fluxo laminar classe 100.

Para o Método Pour-Plate, o número médio de colônias foi multiplicado pelo fator de diluição e na metodologia da micro-gota, este valor foi multiplicado por 20 (para o resultado ser fornecido por mL) e pelo fator de diluição.

Na segunda etapa do estudo, as amostras foram submetidas a choque térmico, sendo aquecidas a 95°C-100°C por 15 minutos e rapidamente resfriadas em banho de gelo. Sendo as amostras novamente quantificadas pelos dois métodos. Foram denominadas de **com** e **sem** tratamento térmico.

A Análise estatística foi feita pela descrição, exploração e comparação dos dados por medida de centro (Teste de Homogeneidade ou Teste F – Senedecor e Teste t-Student), calculados através do software Statgraphics plus 5.0 e demonstrada pela medida de posição relativa via boxplot (Análise Exploratória de Dados-AED).

#### 4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM MEIO INDUSTRIALIZADO (TSB)

Foram preparados oito tubos de ensaio de vidro, contendo cada um 30,0 mL de TSB, marca Merck, sendo autoclavados por 15 minutos/121°C/1atm.

Como inóculo, utilizou-se 100 µL/tubo da suspensão aquosa de esporos, CPPI-lote 01/06, cuja população determinada foi de  $9,8 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Após a inoculação, os tubos foram incubados em estufa BOD com circulação de ar na temperatura de 57,5°C±2,5°C. A contagem das células viáveis totais foi realizada em duplicata, desde o tempo zero até vinte e quatro horas de incubação, com intervalos de 3 horas, pelo método da inoculação de microgota em superfície, em condições assépticas e sob fluxo laminar classe 100.

A quantificação das células viáveis totais foi realizada com o auxílio de contador de colônias Phoenix CP 600, pela média das contagens, multiplicando-se os valores obtidos por 20 (para obter o resultado em UFC.mL<sup>-1</sup>) e pelo fator de diluição.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MEIOS DE CULTIVO FORMULADOS COM RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGRO-INDUSTRIAIS NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS ÍNTEGROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

##### 4.4.1 Meio padrão (controle)

Como controle foi utilizado meio industrializado e padronizado pelo CPPI, para a produção do IB-Esteriteste, com composição: TSB, 3,0g%; amido solúvel,

0,1g%; cloreto de cálcio bi hidratado, 0,018g% e púrpura de bromocresol, 0,001g%. Ajuste de pH para  $6,8 \pm 0,1$  com soluções 0,1 N de HCl ou NaOH, conforme a necessidade.

No preparo dos meios para a germinação dos esporos foram utilizados, TSB da marca Acumedia, cloreto de cálcio bihidratado da marca Merck, amido solúvel da marca Synth e púrpura de bromocresol da marca Vetec. Para facilitar o preparo dos meios, o púrpura de bromocresol e o cloreto de cálcio bihidratado foram adicionados na forma de solução a 1,0g%.

#### 4.4.2 Meios com subprodutos/resíduos agroindustriais

Estudos preliminares foram realizados para avaliar a possibilidade da substituição do caldo de soja tripticaseína (TSB) do meio padrão Esteriteste-CPPI, na produção de IB autocontidos, por subprodutos e/ou resíduos da agroindústria.

Foram testados os melaços de soja e cana-de-açúcar e as vinhaças de soja e cana-de-açúcar.

A vinhaça e o melaço de cana-de-açúcar foram cedidos pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A vinhaça e o melaço de soja foram provenientes da IMCOPA, empresa situada em Araucária - Paraná, que industrializa soja e derivados, trabalhando com grãos não-transgênicos.

A determinação do grau Brix nas amostras foi realizado com refratômetro portátil para açúcares, modelo RT-30ATC - Instrutherm, sendo as amostras previamente aclimatadas para 20°C. As leituras foram realizadas em duplicata.

Quatorze amostras de vinhaça de soja foram coletadas em dias diferentes para avaliar a variabilidade de sua composição, sendo identificadas como lotes de um a quatorze.

A caracterização físico-química do melaço e da vinhaça de soja foi realizada por:

a) Análises físico-químicas foram realizadas pelo Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA-UFPR), em um lote de melaço de soja e quatro lotes de vinhaça de soja (lote 11, lote 12, lote 13 e lote 14). Foram determinadas as concentrações de carboidratos totais, proteínas, gordura total, resíduo mineral fixo, umidade e substâncias voláteis. Para os lotes 11, 12 e 13 de vinhaça de soja, foram realizadas ainda análises para determinação da demanda

bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO). Foram aplicadas as metodologias do Instituto Adolfo Lutz, 4<sup>o</sup> edição.

b) Qualificação e quantificação dos carboidratos presentes nas quatorze amostras de vinhaça de soja foram determinados por HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), utilizando cromatógrafo líquido da marca Shimadzu (módulo de distribuição de solvente LC 10 AD, forno CTO 10 A, detector de índice de refração RID 10 A, integrador CR 6 A), com coluna de separação Aminex HPX 87H que separa os componentes da amostra por exclusão iônica e interação hidrofóbica, instalado no laboratório de bioprocessos da UFPR. As condições da análise foram: fase móvel ácido sulfúrico 5mM, 0,6 mL/minuto, 60°C com volume de injeção de 50µL. Foram utilizados padrões de 1g/L e 2g/L. As amostras foram previamente centrifugadas a 10.000g por 5 minutos e filtradas em membrana PVDF de 0,22 µm da Millipore.

Os resíduos testados foram submetidos a diferentes diluições: vinhaças (1:25; 1:40; 1:50; 1:70; 1:90 e 1:100) e os melaços (1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 e 1:600). O pH foi corrigido com soluções de NaOH e HCl 0,1 N conforme a necessidade. Como se observou uma diminuição do pH nos meios com subprodutos ou resíduos agroindustriais após a autoclavação, o pH destes meios foram ajustados para  $7,1 \pm 0,1$ .

As vinhaças de soja e cana-de-açúcar foram mantidas congeladas a -18°C, enquanto os melaços de soja e cana-de-açúcar foram conservados sob refrigeração, em temperatura de 2°C a 8°C. Os componentes do meio industrializado foram mantidos à temperatura ambiente enquanto desidratados, sendo conservados sob refrigeração em temperatura de 2°C a 8°C após reconstituição.

Utilizou-se pHmetro marca Hanna HI 8417 para o ajuste dos pHs. Os meios preparados foram esterilizados em autoclave gravitacional marca Fabbe-Primar, com capacidade para 75 litros, num tempo de 15 minutos/121°C/1 atm.

Para a incubação, utilizou-se estufa com circulação de ar marca Logen na temperatura de  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ . Os experimentos foram realizados nas dependências dos laboratórios do CPPI, onde é adotado um programa de acompanhamento dos equipamentos, sendo realizadas manutenções preventivas a cada seis meses e corretivas sempre que necessário.

As estufas BOD, refrigeradores e freezers do CPPI têm suas temperaturas averiguadas duas vezes ao dia. A autoclave tem monitoramento semanal de seus

ciclos com IB e semestralmente é submetida a controle externo, quando ocorre a aferição e calibração do manômetro.

As amostras analisadas foram aliquotadas em frascos-ampola tipo I em borosilicato, num volume de 3,0 mL/frasco, tampados com rolhas de borracha siliconada e selados com lacres de alumínio, para reproduzir as condições do IB padrão Esteriteste-CPPI. Sendo mantidas sob refrigeração (2°C a 8°C).

Os frascos que apresentaram crescimento microbiano com alteração na coloração do meio de violeta para amarelo, apresentando turbidez foram considerados como positivo (+). Os frascos em que o meio permaneceu violeta foram considerados negativos (-), pois não ocorreu germinação dos esporos.

Os procedimentos de inoculação e fracionamento das amostras foram realizados em condições assépticas e sob fluxo de ar filtrado horizontal, classe 100.

#### 4.4.2.1 Avaliação da capacidade germinativa dos meios de cultura produzidos com vinhaças (soja e de cana-de-açúcar) e melaços (soja e cana-de-açúcar)

Foram preparados 24 meios utilizando várias diluições das vinhaças de soja e cana-de-açúcar (1:25; 1:40; 1:50; 1:70; 1:90 e 1:100) e dos melaços de soja e cana-de-açúcar (1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 e 1:600) em substituição ao TSB,3,0g% na formulação do meio controle utilizado na produção do IB Esteriteste-CPPI. Os demais constituintes: púrpura de bromocresol, 0,001g%; cloreto de cálcio bi hidratado, 0,018g% e amido solúvel, 0,1g% foram mantidos nas mesmas concentrações do meio padrão CPPI (controle).

As formulações dos meios com as vinhaças de soja e cana-de-açúcar encontram-se na TABELA 5.

TABELA 5 – FORMULAÇÃO DOS MEIOS COM VINHAÇAS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR PARA A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

| Meio/Resíduo agroindustrial | Conc.*<br>(mL%) | PBC**<br>sol.1,0g%<br>(mL%) | CaCl <sub>2</sub><br>sol.1,0g%<br>(mL%) | TSB***<br>(g%) | Amido<br>(g%) |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|---|----------------|---------------|
| Vinhaça de soja-1:25        | 4,0             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de soja-1:40        | 2,5             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de soja-1:50        | 2,0             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de soja-1:70        | 1,5             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de soja-1:90        | 1,2             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de soja-1:100       | 1,0             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de cana-1:25        | 4,0             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de cana-1:40        | 2,5             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de cana-1:50        | 2,0             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de cana-1:70        | 1,5             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de cana-1:90        | 1,2             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Vinhaça de cana-1:100       | 1,0             | 0,1                         | 1,8                                     | -----          | 0,1           |
| Padrão CPPI (controle)      | -----           | 0,1                         | 1,8                                     | 3,0            | 0,1           |

NOTA: \*Conc.-concentração; \*\*PBC-púrpura de bromocresol; \*\*\*TSB- caldo de soja tripticaseína  
 FONTE: O autor (2007)

A TABELA 6 contém o detalhamento das formulações dos meios preparados com os melaços de soja e cana-de-açúcar.

TABELA 6 – FORMULAÇÃO DOS MEIOS COM MELAÇOS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR PARA A GERMINAÇÃO DOS ESPOROS do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

| Meio/Sub-produto Agroindustrial | Conc.*<br>(g%) | PBC**<br>Sol.1,0g%<br>(mL%) | CaCl <sub>2</sub><br>Sol.1,0g%<br>(mL%) | TSB***<br>(g%) | Amido<br>(g%) |
|---------------------------------|----------------|-----------------------------|---|----------------|---------------|
| Melaço de soja-1:25             | 4,0            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de soja-1:50             | 2,0            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de soja-1:100            | 1,0            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de soja-1:200            | 0,5            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de soja-1:400            | 0,25           | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de soja-1:600            | 0,20           | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de cana-1:25             | 4,0            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de cana-1:50             | 2,0            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de cana-1:100            | 1,0            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de cana-1:200            | 0,5            | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de cana-1:400            | 0,25           | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |
| Melaço de cana-1:600            | 0,20           | 0,1                         | 1,8                                     | ----           | 0,1           |

NOTA:\*Conc.-concentração; \*\*PBC-púrpura de bromocresol; \*\*\*TSB- caldo de soja tripticaseína  
 FONTE: O Autor (2007)

A verificação da capacidade germinativa dos meios foi realizada com critérios estabelecidos para indicadores biológicos autocontidos pela USP 24 (2000) e USP 29 (2006).

Após o preparo e esterilização dos meios, estes foram divididos em dois grupos. Um foi inoculado com a suspensão aquosa de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, CPPI-lote 02/06, cujo No (população inicial) foi quantificada em  $2,6 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, com quantidade suficiente para obtenção da concentração de  $5,0 \times 10^4$  UFC.3mL<sup>-1</sup> (padronização da resistência térmica), sendo



denominado COM ESPOROS e o outro grupo permaneceu sem inóculo, sendo chamado de SEM ESPOROS.

O grupo COM ESPOROS foi submetido a testes de viabilidade e de resistência térmica no Tempo de Sobrevivência (TS) de 5 minutos e no Tempo de Morte (TM) de 15 minutos (USP 24, 2000). A determinação da habilidade do meio em promover o crescimento após exposição às condições de esterilização (USP 24, 2000) e a pesquisa de contaminantes, foram aplicadas ao grupo de frascos SEM ESPOROS, como demonstrado na FIGURA 22.

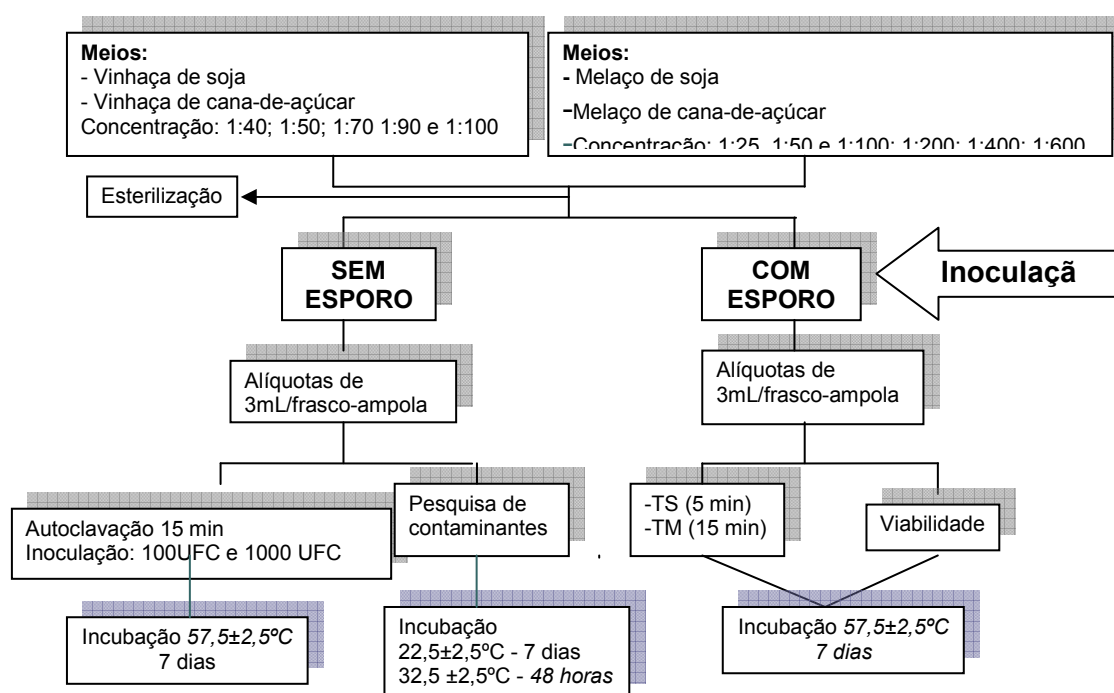


FIGURA 22 - FLUXOGRAMA DOS TESTES DE VIABILIDADE E VERIFICAÇÃO DOS MEIOS PRODUZIDOS COM VINHAÇAS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR E MELAÇOS DE SOJA E CANA-DE-AÇÚCAR EM DIVERSAS DILUIÇÕES

FONTE: O autor (2007)

#### a) Viabilidade

Foram incubados em estufa BOD com circulação de ar na temperatura de  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ , dez frascos-ampola de cada meio COM ESPOROS ( $5,0 \times 10^4 \text{ UFC} \cdot 3\text{mL}^{-1}$ ). Foram realizadas leituras diárias para verificação do crescimento até o sétimo dia.

- b) Capacidade germinativa no tempo de sobrevivência (TS) e tempo médio de morte (TM)

Dez frascos de cada lote dos meios COM ESPOROS ( $5,0 \times 10^4$  UFC. $3\text{mL}^{-1}$ ) foram submetidos a cinco e quinze minutos de autoclavação a  $121^\circ\text{C}/1\text{atm}$ . Posteriormente foram incubados e observados diariamente para verificar a quantidade de frascos que apresentaram crescimento microbiano, até o sétimo dia de incubação.

- c) Pesquisa de contaminantes

Foram incubados 10 frascos-ampola de cada lote testado, SEM ESPOROS, em estufa, nas temperaturas de  $57,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$ ,  $22,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$  e  $32,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$  por sete dias, diariamente, foi realizada inspeção visual dos frascos para verificar algum indício de crescimento microbiano (mudança na coloração do meio e turbidez).

- d) Verificação da capacidade do meio em germinar após submissão a esterilização adicional de 15 minutos

Vinte frascos-ampola de cada meio SEM ESPOROS foram submetidos à nova autoclavação por mais 15 minutos/ $121^\circ\text{C}/1\text{atm}$ .

Foi realizada uma diluição seriada decimal, com a suspensão concentrada de esporos, adicionando-se 0,5 mL em um frasco-ampola contendo 4,5 mL de água destilada estéril. Após agitação em vórtex por um minuto, 0,5 mL da primeira diluição foi inoculado no segundo frasco e assim sucessivamente até obter as diluições desejadas (TABELA 7). Dez amostras foram inoculadas com a suspensão aquosa de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 CPPI lote 02/06, na concentração de 100 UFC/frasco (0,1 mL do frasco 5) e 10 amostras com 1000 UFC/frasco (0,1 mL do frasco 4).

Os frascos foram novamente tampados com rolha de borracha e selados com lacre de alumínio. Permaneceram incubados em estufa A  $57,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  por até sete dias, sendo observados diariamente para averiguar o crescimento microbiano.

TABELA 7 – DILUIÇÃO SERIADA DECIMAL DA SUSPENSÃO CONCENTRADA DE ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

| <b>Frascos</b>                    | <b>Frasco 1<br/>suspensão<br/>pura</b> | <b>Frasco 2<br/>diluição 1/10</b> | <b>Frasco 3<br/>Diluição 1:100</b> | <b>Frasco 4<br/>Diluição 1/1000</b> | <b>Frasco 5<br/>Diluição 1:10 000</b> |
|-----------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Volume de<br/>inóculo (mL)</b> | (UFC / inoculo)                        | (UFC / inoculo)                   | (UFC / inoculo)                    | (UFC / inoculo)                     | (UFC / inoculo)                       |
| 1,0                               | $10^7$                                 | $10^6$                            | $10^5$                             | $10^4$                              | $10^3$                                |
| 0,1                               | $10^6$                                 | $10^5$                            | $10^4$                             | $10^3$                              | $10^2$                                |

FONTE: O Autor (2007)

Nos frascos que apresentaram alteração de coloração, foram preparados esfregaços e as lâminas coradas pelo método de Gram, para confirmar a presença de bacilos gram positivos.

#### 4.4.2.2 Cinética de germinação dos esporos nos meios: vinhaça de soja cen – trifugada, vinhaça de soja sem centrifugar e E-CPPI (controle)

Este estudo teve como principal objetivo, comparar a cinética da germinação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, frente a um meio de germinação composto por vinhaça de soja e o meio padrão E-CPPI (controle), fazendo a substituição do TSB do meio padrão pelo resíduo da agroindústria. Foi utilizado o lote 14 de vinhaça de soja na concentração de 1:70, “in natura” e após centrifugação por 5 minutos a 3041 rpm em centrífuga marca Excelsa 2. Foram adicionados em ambos os meios: cloreto de cálcio bihidratado, 0,018g%; amido solúvel, 0,1g% e púrpura de bromocresol, 0,001g%, conforme TABELA 8.

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS UTILIZADOS NA CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

| <b>Meio</b> | <b>Caldo de soja<br/>tripticaseína-<br/>TSB<br/>(g%)</b> | <b>Vinhaça<br/>de soja<br/>(mL%)</b> | <b>Vinhaça de<br/>soja<br/>centrifugada<br/>(mL%)</b> | <b>CaCl<sub>2</sub><br/>Sol. 0,1g%<br/>(mL%)</b> | <b>Amido<br/>(g%)</b> | <b>Púrpura de<br/>bromocresol<br/>Sol. 0,1g%<br/>(mL%)</b> |
|-------------|--|--------------------------------------|---|--|-----------------------|--|
| 01          | -----  | 1,4                                  | -----   | 1,8  | 0,1                   | 0,1  |
| 02          | -----  | -----                                | 1,4   | 1,8  | 0,1                   | 0,1  |
| 03          | 3,0  | -----                                | -----   | 1,8  | 0,1                   | 0,1  |

FONTE: O Autor (2007)

Foram inoculados esporos da suspensão aquosa CPPI - lote 02/06, em quantidade suficiente para a obtenção da concentração padronizada de  $5,0 \times 10^4$  UFC.3mL<sup>-1</sup>

Oitenta frascos-ampola de cada meio inoculado com os esporos foram incubados a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ . A cada três horas foram retiradas 10 amostras/meio e feito um “pool” em tubo de ensaio. A germinação dos esporos foi observada pela mudança na coloração dos meios que ocorre pela mudança de pH decorrente do consumo do substrato pelo microorganismo em sua forma vegetativa (bacilo) e pela contagem das células totais através do método de semeadura em superfície de TSA.

Após, as mesmas amostras foram novamente lacradas e submetidas ao vapor fluente a  $100^{\circ}\text{C}$  em autoclave por 5 minutos para eliminação das formas vegetativas. Nova contagem de células foi realizada para a determinação das células viáveis totais originadas dos esporos sobreviventes ao tratamento térmico.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DA GERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR, DE MEIOS DE CULTIVO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O fluxograma dos ensaios realizados para verificar a capacidade dos meios estudados em promover a germinação dos esporos danificados pelo calor encontra-se na FIGURA 23.

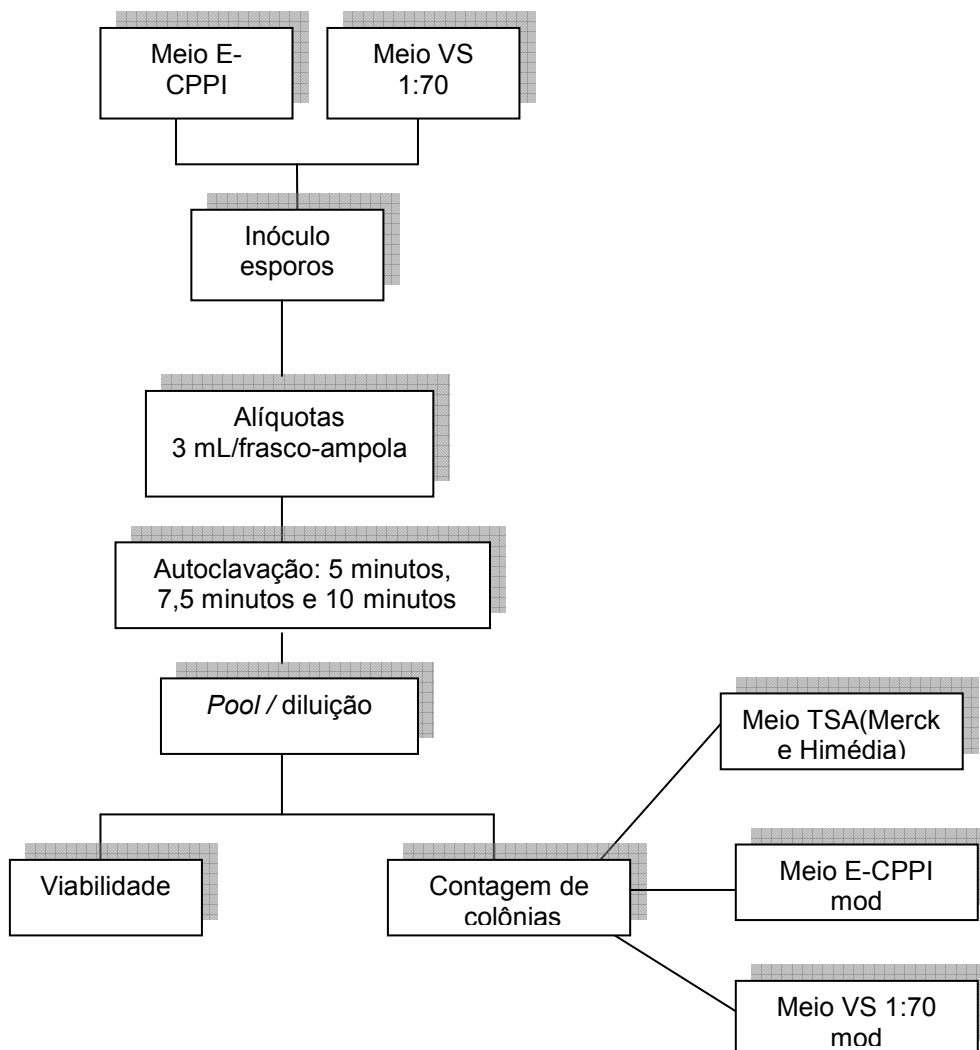


FIGURA 23 – FLUXOGRAMA DOS TESTES REALIZADOS PARA DETERMINAÇÃO DO MEIO CAPAZ DE QUANTIFICAR OS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 DANIFICADOS PELA AÇÃO DO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO

FONTE: O Autor (2007)

#### 4.5.1 Meios para a germinação dos esporos

Foram preparados dois caldos (meios líquidos) para a recuperação dos esporos danificados pela ação do calor: meio 1 (E-CPPI): TSB, 3,0g%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018g%; amido solúvel, 01g% e púrpura de bromocresol, 0,001g% e o meio 2 (VS 1:70) com a formulação igual a do meio 1, porém substituindo o TSB por vinhaça de soja a 1:70. Foi utilizado o lote 14 da vinhaça de soja.

Os caldos foram inoculados com o concentrado de esporos CPPI-lote 02/06 em quantidade suficiente para obter a concentração de  $5,0 \times 10^4$  UFC.3mL<sup>-1</sup>, sendo aliqüotados em frasco-ampola num volume de 3 mL/frasco. Os esporos foram

danificados pelo calor, submetendo-se amostras contendo dez frascos de cada meio a autoclavação nos tempos subletais de 5 minutos, 7,5 minutos e 10 minutos a 121°C/1atm. Foi feito um “pool” das amostras (dez frascos de cada meio/tempo de autoclavação) e os esporos sobreviventes foram quantificados, após diluição seriada decimal, nos meios geleificados (TSA, E-CPPI modificado E VS 1:70 modificado), cujas formulações foram testadas. Com o restante do “pool” foi averiguada a viabilidade dos esporos nos meios de germinação, incubando-os a 57,5°C±2,5°C em estufa BOD por até 48 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados foram obtidos pela média.

#### 4.5.2 Meios para quantificação dos esporos

Este estudo foi desenvolvido para comparar a capacidade de quantificação dos esporos danificados pelo calor úmido sob pressão nos meios de germinação testados. O fluxograma encontra-se na FIGURA 22.

A quantificação dos esporos sobreviventes ao tratamento térmico (item 4.5.1) foi realizada pelo método da micro-gota nos meios: TSA (marcas Himédia e Merck); E-CPPI modificado: TSB, 3,0g%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018g%; amido solúvel, 01g% e 1,5g% de ágar e VS 1:70 modificado: cloreto de cálcio bihidratado, 0,018g%; amido solúvel, 01g%; vinhaça de soja 1:70 e 1,5g% de ágar.

### 4.6 DETERMINAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* DANIFICADOS PELO CALOR

#### 4.6.1 Concentração da vinhaça de soja

##### 4.6.1.1 Inóculo

Suspensão de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 CPPI-lote 02/06, No =  $2,6 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, e termorresistência padronizada para  $5,0 \times 10^4$  UFC.3mL<sup>-1</sup>. Portanto, foram adicionados 0,58 mL da suspensão aquosa de esporos para cada 300,0 mL de meio de cultura.

#### 4.6.1.2 Meios

Foram preparados oito meios com diluições de 1:25, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 e 1:100 da vinhaça de soja lote 14, acrescidos de amido solúvel, 0,1g%; cloreto de cálcio bihidratado, 0,018g% e púrpura de bromocresol, 0,001g%. Como controle utilizou-se o meio para produção do Esteriteste-CPPI. As formulações dos meios encontram-se na TABELA 9.

TABELA 9 – FORMULAÇÃO DOS MEIOS PARA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 COM DIVERSAS DILUIÇÕES DE VINHAÇA DE SOJA

| Concentração                 | 1:25  | 1:50  | 1:60  | 1:70  | 1:80  | 1:90  | 1:100 | Padrão CPPI controle |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
| Componentes                  |       |       |       |       |       |       |       |                      |
| Vinhaça de soja (mL%)        | 4,0   | 6,0   | 5,0   | 4,3   | 3,75  | 3,33  | 3,0   | ---                  |
| Cloreto de cálcio (mL%)      | 1,8   | 1,8   | 1,8   | 1,8   | 1,8   | 1,8   | 1,8   | 1,8                  |
| Amido (g%)                   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1                  |
| Púrpura de bromocresol (mL%) | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1   | 0,1                  |
| TSB (g%)                     | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 3,0                  |

FONTE: O Autor (2007)

#### 4.6.1.3 Análises

As amostras foram submetidas aos testes de viabilidade, termorresistência e contagem das células viáveis totais (para determinação de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{\text{SK}}$ ), conforme o descrito no item 4.1.3.3.3 (b, c, d, e). Foram calculados os valores dos tempos de sobrevivência (TS) e tempo de morte (TM), conforme o recomendado pela USP 29 (2006) e FDA (2001), descrito no item 3.2.2.4.

O fracionamento dos meios ocorreu em condições assépticas sob fluxo de ar filtrado classe 100. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram obtidos pela média.

#### 4.6.2 Extrato de leveduras

##### 4.6.2.1 Meios

Foram produzidos sete diferentes meios utilizando o lote 14 da vinhaça de soja na concentração de 1:70 como base e foram adicionados: cloreto de cálcio bihidratado, 0,018 g %; amido, 0,1 g% e púrpura de bromocresol, 0,001g%. Ao meio básico formulado, foi acrescentado extrato de leveduras nas concentrações de:

0,0g% (meio 1), 0,05g% (meio 2), 0,1g% (meio 3), 0,2g% (meio 4), 0,4g% (meio 5), 0,8g% (meio 6) e 1g% (meio 7). Como controle usou-se o meio Esteriteste-CPPI (meio 8). As formulações estão detalhadamente descritas na TABELA 10.

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA COM VINHAÇA DE SOJA E VÁRIAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURAS

| MEIOS<br>COMPONENTES                 | 1               | 2               | 3             | 4             | 5             | 6             | 7           | 8     |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------|-------|
|                                      |                 |                 |               |               |               |               |             |       |
| Vinhaça de soja 1:70-lote 14 (mL%)   | 1,4             | 1,4             | 1,4           | 1,4           | 1,4           | 1,4           | 1,4         | ----- |
| CaCl <sub>2</sub> sol.1%) - (mL%)    | 1,8             | 1,8             | 1,8           | 1,8           | 1,8           | 1,8           | 1,8         | 1,8   |
| Amido (g%)                           | 0,1             | 0,1             | 0,1           | 0,1           | 0,1           | 0,1           | 0,1         | 0,1   |
| Púrpura de bromocresol-sol.1 % (mL%) | 0,1             | 0,1             | 0,1           | 0,1           | 0,1           | 0,1           | 0,1         | 0,1   |
| TSB (g%)                             | -----           | -----           | -----         | -----         | -----         | -----         | -----       | 3,0   |
| Extrato de leveduras (g)-porcentagem | -----<br>(0,0%) | 0,15<br>(0,05%) | 0,3<br>(0,1%) | 0,6<br>(0,2%) | 1,2<br>(0,4%) | 2,4<br>(0,8%) | 3<br>(1,2%) | ----- |

FONTE: O Autor (2007)

Os meios foram acondicionados em balões de vidro, fechados por tampão de algodão envolto em gaze e autoclavados por 15 minutos a 121°C / 1atm.

#### 4.6.2.2 Inóculo

A suspensão de esporos CPPI - lote 02/06 foi utilizada como inóculo. Foram adicionados 0,58 mL para cada 300,0 mL de meio, obtendo-se a concentração de  $5,0 \times 10^4$  UFC.3mL<sup>-1</sup>.

#### 4.6.2.3 Controles de qualidade

Após a inoculação da suspensão de esporos e fracionamento dos meios, estes foram submetidos às seguintes análises: determinação de células viáveis totais pelo método da micro-gota, viabilidade e termorresistência. Com os resultados obtidos foi calculado o valor de U<sub>SK</sub> (tempo médio de morte) e D<sub>121°C</sub> (tempo de termodestruição) pelo Método da fração negativa Spearman-Kaber.



#### 4.6.3 Amido

Foram avaliados os meios com vinhaça de soja na diluição 1:70 (v/v), acrescidos de 0,018g% de  $\text{CaCl}_2$ ; 0,001g% de púrpura de bromocresol e 0,8g% de extrato de leveduras, com e sem 0,1g% de amido solúvel. Os meios foram inoculados com o concentrado de esporos lote CPPI-01/07 ( $\text{No} = 1,2 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) com volume suficiente para obtenção de  $5,0 \times 10^3 \text{ UFC.3mL}^{-1}$ . Em paralelo foram realizados testes com o meio padrão E-CPPI.

Os meios preparados foram aliquotados em frascos-ampola num volume de 3,0 mL/frasco e submetidos a contagem de células viáveis totais, viabilidade e termorresistência. Foram calculados os valores de  $U_{SK}$ ,  $D_{121^\circ\text{C}}$ , TS e TM.

Foi preparado um inóculo em 5,0 mL de TSB, adicionando-se 20  $\mu\text{L}$  do concentrado de esporos CPPI lote-01/07 e incubado a  $57,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$  por 18 horas.

Para a detecção de atividade amilásica, foram preparadas placas de Petri com um meio composto por: extrato de carne, 3,0g%; peptona, 0,5g%; amido solúvel, 0,2g% e ágar, 2g%. Após a solidificação do meio foram feitos orifícios de aproximadamente 0,8 cm no centro das placas. Foram inoculados 100  $\mu\text{L}$  do crescimento microbiano obtido no meio TSB em cada orifício.

As placas foram incubadas por 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionada uma solução de iodo a 0,1N sobre o crescimento microbiano. A leitura final foi feita após 15 minutos.

As análises foram realizadas em triplicata em condições assépticas e sob fluxo laminar classe 100.

#### 4.6.4 Cálcio

Foi preparado um meio composto por: vinhaça de soja 1:70 (v/v); amido solúvel, 0,1g%; cloreto de cálcio, 0,018g%; extrato de leveduras, 0,8g% e púrpura de bromocresol, 0,001g%, para ser utilizado como controle. O meio teste consistiu da mesma formulação, porém sem o cloreto de cálcio. O pH dos meios foi ajustado para 7,0 com solução NaOH 0,1N, sendo autoclavados por quinze minutos a  $121^\circ\text{C}/1\text{atm}$ .

Esporos do concentrado lote CPPI-02/06 foram inoculados com quantidade suficiente para obter a concentração padronizada de  $5,0 \times 10^4 \text{ UFC.3mL}^{-1}$ . Os meios foram aliquotados em frascos-ampola num volume de 3,0 mL/frasco. Foram

realizados testes de viabilidade, termorresistência e contagem de colônias para a obtenção dos valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{\text{SK}}$ . Os ensaios foram realizados em duplicata e resultado obtido pela média.

#### 4.6.5 pH

Foram preparados sete lotes do meio VS 1:70+EL(0,8g%), sendo cada um com um pH diferente: 6,0; 6,3; 6,6; 6,9; 7,1 e 7,3, ajustados com soluções 0,1N de HCl e NaOH, conforme a necessidade. Os meios foram inoculados com a suspensão de esporos CPPI lote-03/07, de forma a obter a concentração padronizada de  $5,0 \times 10^4 \text{ UFC.3mL}^{-1}$ . Os meios foram aliquotados em frascos-ampola e submetidos a termorresistência, contagem de células viáveis e viabilidade. Foram calculados os valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ,  $U_{\text{SK}}$ , TS e TM. Os testes foram realizados em duplicata e o resultado foi dado pela média.

#### 4.7 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MEIO DE CULTIVO DESENVOLVIDO COM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL E O MEIO CONTROLE E-CPPI

Foram preparados dois meios de cultura:

- Meio 1 (E-CPPI): TSB, 3,0g%; amido solúvel, 0,1g%; cloreto de cálcio, 0,018g%; púrpura de bromocresol, 0,001g%
- Meio 2 (VS+EL 1:70): vinhaça de soja na diluição 1:70; amido solúvel, 0,1g%; cloreto de cálcio, 0,018g%; púrpura de bromocresol, 0,001g% e extrato de leveduras 0,8g%

O pH dos meios foram ajustados com soluções 0,1 N de NaOH e HCl, conforme a necessidade até obter o pH  $6,8 \pm 0,1$  para o meio 1 (E-CPPI) e  $7,0 \pm 0,1$  para o meio 2 (VS+EL). Após, foram autoclavados por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}/1\text{atm}$ .

O lote CPPI-01/07 de concentrado de esporos foi utilizado como inóculo para a obtenção da concentração padronizada de  $5,0 \times 10^4 \text{ UFC.3mL}^{-1}$ . Foi utilizado o lote 14 de vinhaça de soja.

Os meios inoculados foram aliquotados em frascos-ampola num volume de 3 mL/frasco, e submetidos a autoclavação num tempo subletal de oito minutos.

Foram realizados testes para obtenção dos seguintes parâmetros:

- a) Contagem de células viáveis totais
- b) Viabilidade

- c) Valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$
- d) Valor de  $U_{sk}$
- e) Tempo de sobrevivência
- f) Tempo de morte
- g) Valor de  $Z$

Para obtenção do valor de  $Z$  foram realizadas termorresistências nas temperaturas de  $121^{\circ}\text{C}$  e  $118^{\circ}\text{C}$  e o cálculo foi realizado conforme o recomendado pela ISO 11138-3 (1995), através da fórmula:

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2}$$

Os meios foram submetidos aos seguintes tempos de autoclavação: 5 minutos, 7,5 minutos, 10 minutos, 12,5 minutos, 15 minutos e 17,5 minutos para  $121^{\circ}\text{C}$  e 15 minutos, 18,5 minutos, 20 minutos, 22,5 minutos, 25 minutos, 27,5 minutos e 30 minutos para  $118^{\circ}\text{C}$ .

Os testes foram realizados em duplicata e o resultado obtido pela média.

#### 4.8 CINÉTICA DA GERMINAÇÃO E CONSUMO DE NUTRIENTES DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 DANIFICADOS PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO

Foi realizada a cinética do crescimento microbiano para observar a capacidade dos meios testados em germinar os esporos danificados após submissão a um tempo subletal de oito minutos de autoclavação. Os meios testados foram compostos pela vinhaça de soja (lote 14) na concentração 1:70 (VS 1:70-sem centrifugar), acrescido de amido 0,1g%, cloreto de cálcio bihidratado, 0,018g%, púrpura de bromocresol, 0,001g%, com e sem 0,8g% de extrato de leveduras. A suspensão de esporos CPPI-lote 02/06 foi utilizada como inóculo. Os meios foram fracionados em frascos-ampola com alíquotas de 3,0 mL/meio. Foram incubados 80 frascos de cada meio a  $57,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Com intervalos de 3 horas foram retirados 10 frascos/meio, feito um “pool” e realizadas contagens de células viáveis totais, contagem de esporos, determinação de carboidratos totais, doseamento de proteínas totais e determinação do pH.

A quantificação das células viáveis totais foi realizada pelo Método da microgota, usando o meio ágar E-CPPI modificado (item 4.5.2). A determinação do número de esporos viáveis foi realizada da mesma maneira, sendo as amostras previamente submetidas a vapor fluente de 5 minutos a 100°C em autoclave, para a eliminação das células vegetativas.

Os carboidratos foram determinados por HPLC e as proteínas pelo método de Lowry (PARANÁ POP 3.10.03,2003).

Para a determinação do pH foi utilizado pHmetro marca Hanna – HI 8417.

#### 4.9 VALIDAÇÃO DA EFICÁCIA DOS MEIOS DE CULTURA COM RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA ALIMENTAR (VINHAÇA DE SOJA) EM GERMINAR ESPOROS DANIFICADOS DE *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

O FDA (2001) recomenda que para avaliar os estudos da eficácia dos indicadores biológicos, deve-se testar três diferentes lotes de esporos, quanto a viabilidade da população e as características de resistência térmica ao processo de esterilização utilizado.

Para tanto, foram realizados novamente os testes do item 4.4.2.1 (fluxograma na FIGURA 21), sendo utilizados quatro lotes distintos de vinhaça de soja na produção do meio de recuperação e três lotes de suspensão aquosa de esporos como inóculo.

Foram realizadas análises para verificação de: viabilidade, presença de contaminantes, resistência térmica no tempo de sobrevivência (TS) de cinco minutos e no tempo médio de morte (TM) de quinze minutos, habilidade do meio em promover a germinação dos esporos após exposição adicional às condições de esterilização (15minutos/121°C/1atm) e janela de sobrevivência/morte.

##### 4.9.1 Inóculo

Foram utilizados os lotes CPPI-02/06 (concentração  $8,6 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>), CPPI-01/07 (concentração  $1,2 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e CPPI-02/07 (concentração  $1,2 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) de suspensão aquosa de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. Os inóculos foram realizados de acordo com as concentrações padronizadas para cada lote de suspensão aquosa: lote 02/06 e lote 02/07,

concentração de  $5,0 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, lote 01/07 concentração de  $5,0 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> (TABELA 11). Cada lote de vinhaça de soja foi testado com os três lotes de concentrado de esporos.

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO AQUOSA DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953

| Lote da suspensão de esporos | Concentração da suspensão (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | Concentração padronizada da suspensão de esporos (UFC.mL <sup>-1</sup> /frasco-ampola-3mL) |
|------------------------------|---|--|
| Lote 02/06                   | $8,6 \times 10^6$                                 | $5,0 \times 10^4$  |
| Lote 01/07                   | $1,2 \times 10^7$                                 | $5,0 \times 10^3$  |
| Lote 02/07                   | $1,2 \times 10^7$                                 | $5,0 \times 10^4$  |

FONTE: O Autor (2006; 2007)

#### 4.9.2 Meios

A formulação dos meios (TABELA 12) foi: vinhaça de soja 1:70, acrescida de 0,1g% de amido solúvel, 0,018g% de cloreto de cálcio bihidratado e 0,001g% de púrpura de bromocresol, sem e com 0,8g% de extrato de leveduras.

Foram utilizados os lotes 11, 12, 13 e 14 de vinhaça de soja, sendo os meios denominados de 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Os meios sem extrato de leveduras foram denominados de grupo A e os meios com extrato de leveduras foram identificados como B, ficando, portanto os meios estudados denominados de 1 A, 2 A, 3 A, 4 A, 1B, 2B, 3B e 4B, respectivamente para os lotes de vinhaça 11, 12, 13 e 14, sem e com extrato de leveduras.

TABELA 12 –COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE GERMINATIVA DE ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953

| Meios | Vinhaça de soja (mL%) | Extrato de leveduras (g%) | CaCl <sub>2</sub> sol. 1% (mL%) | Púrpura sol. 1% (mL%) | Amido (g%) |
|-------|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------|
| 1 A   | 1,4                   | ----                      | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |
| 2 A   | 1,4                   | ----                      | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |
| 3 A   | 1,4                   | ----                      | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |
| 4 A   | 1,4                   | ----                      | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |
| 1 B   | 1,4                   | 0,8                       | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |
| 2 B   | 1,4                   | 0,8                       | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |
| 3 B   | 1,4                   | 0,8                       | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |
| 4 B   | 1,4                   | 0,8                       | 1,8                             | 0,1                   | 0,1        |

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: sol.: solução

#### 4.9.3 Determinação da janela de sobrevivência / morte

O tempo mínimo de esterilização para que haja sobrevivência (TS) de todos os esporos e o tempo mínimo para que ocorra a morte (TM) de todos os esporos num indicador biológico, foram determinados pelas seguintes equações:

Tempo de sobrevivência (TS) não deve ser menor que:

$$\text{Valor de } D \times (\log_{10} \text{ da população de esporos viáveis} - 2)$$

Tempo de morte (TM) não deve ser maior que:

$$\text{Valor de } D \times (\log_{10} \text{ da população de esporos viáveis} + 4)$$

#### 4.10 ESTUDOS DA ESTABILIDADE

Os estudos para determinação da estabilidade do meio para germinação de esporos danificados pelo calor, estão sendo conduzidos com um IB produzido com o meio cuja formulação teve os melhores resultados. É constituído por: vinhaça de soja (diluição 1:70); 0,1g% de amido solúvel, 0,018g% de cloreto de cálcio bihidratado e 0,001g% de púrpura de bromocresol 0,8g% de extrato de leveduras.

Foi utilizado o lote 14 de vinhaça de soja, inoculado com o lote CPPI 02/06 de concentrado de esporos. As análises foram realizadas com três, seis e nove meses de preparo do meio. As amostras foram mantidas resfriadas a temperatura de 2°C a 8°C.

Foram realizados os testes de viabilidade, termorresistência e contagem de células viáveis, obtendo-se desta maneira os valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  (tempo de termodestruição),  $U_{sk}$  (tempo médio de morte), TS (tempo de sobrevivência) e TM tempo de morte.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO AQUOSA CONCENTRADA DE ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

#### a) Resíduos agroindustriais

Os meios preparados com o bagaço de cana-de-açúcar, não apresentaram desenvolvimento microbiano, com ausência de bacilos e esporos, tanto nas amostras coletadas durante o tempo de incubação, como após a lavagem do substrato para retirada de biomassa.

Nos meios preparados com casca de soja foram observados os resultados demonstrados na TABELA 13.

TABELA 13 – CONCENTRAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS PRODUZIDAS COM CASCA DE SOJA

| Meio/ tempo de incubação | 7 dias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | 10 dias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | 13 dias (UFC.mL <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 * (sais)               | 1,3 x10 <sup>6</sup>           | 9,3 x10 <sup>6</sup>            | 5,7 x10 <sup>5</sup>            |
| 2 * (nutrientes+sais)    | 9,2 x10 <sup>5</sup>           | 1,6 x10 <sup>6</sup>            | 1,2 x10 <sup>6</sup>            |
| 3 *                      | 1,1x10 <sup>6</sup>            | 1,3 x10 <sup>6</sup>            | 1,3 x10 <sup>6</sup>            |
| 4 (melaço de soja)       | 2,1x10 <sup>4</sup>            | 2,0x10 <sup>3</sup>             | 2,1 x10 <sup>3</sup>            |
| 5 (controle)             | 3,6x10 <sup>6</sup>            | <b>1,2 x10<sup>7</sup></b>      | <b>1,3 x10<sup>7</sup></b>      |

Obs: \* Resultados iniciais, referentes apenas ao primeiro teste.

FONTE: O Autor (2006)

Os meios preparados com a casca da soja ficaram com uma aparência gelatinosa, provavelmente pela presença de mucilagem na casca da soja, o que dificultou bastante a filtração e conseqüente retirada dos esporos do meio.

O meio 5 (controle CPPI) foi o que apresentou os melhores resultados, não havendo diferença entre o 10º e o 13º dia de esporulação. Apesar dos resultados iniciais indicarem boa capacidade de esporulação para os meios 1, 2 e 3, este dado não foi confirmado quando da realização da duplicata e da triplicata, demonstrando a não reprodutibilidade do método testado.

Devido à dificuldade no manuseio, armazenamento, preparo, caracterização e padronização dos resíduos agroindustriais, aliada a menor produtividade e baixa reprodutibilidade observada, optou-se por utilizar esporos do *Geobacillus stearothermophilus* a partir do meio industrializado para os testes de germinação, visando garantir a obtenção de suspensões de esporos homogêneas e padronizadas.

## b) Meio industrializado

Os frascos utilizados para a padronização das suspensões aquosas concentradas (esporos suspensos em meio de germinação), apresentaram 100% de viabilidade e ausência de contaminantes.

Encontra-se na TABELA 14, as concentrações das suspensões aquosas de esporos e suas respectivas padronizações para a produção de indicadores biológicos.

Foram preparados cinco lotes de suspensão aquosa de esporos. A determinação do número de células viáveis, após a eliminação das células vegetativas (vapor fluente a 100°C por cinco minutos), realizado pelo método pour-plate, forneceu  $N_0$  (número inicial de esporos) variando de  $8,6 \times 10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup> a  $2,0 \times 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup>, conforme demonstrado na TABELA 14.

Os lotes de IB preparados com o meio para germinação padronizado pelo CPPI e inoculados com as suspensões de esporos a serem padronizadas, nas concentrações de  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  UFC.3mL<sup>-1</sup>, foram submetidos ao teste de resistência térmica e as menores concentrações que apresentaram  $D_{121^\circ\text{C}}$  acima de 1,5 minutos e  $U_{sk}$  entre 9 minutos e 15 minutos, foram consideradas como padrão para o lote de suspensão de esporos. Portanto, cada vez que um destes lotes de concentrado de esporos for utilizado para a produção de IB, a população de esporos inoculada deve ser a concentração que foi padronizada. Resultados da concentração considerada como padrão para cada lote encontram-se na TABELA 14.

TABELA 14 - RESULTADOS DAS DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DAS SUSPENSÕES AQUOSAS DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 E DAS CONCENTRAÇÕES PADRONIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE INDICADORES BIOLÓGICOS

| Lote da suspensão aquosa de esporos | Concentração de esporos viáveis na suspensão aquosa (UFC. mL <sup>-1</sup> ) | Concentração padronizada da suspensão aquosa de esporos para a produção de indicadores biológicos (UFC / frasco ampola) |
|-------------------------------------|--|---|
| CPPI 03/05                          | $1,2 \times 10^7$  | $5,0 \times 10^3$   |
| CPPI 01/06                          | $9,8 \times 10^6$  | $5,0 \times 10^4$   |
| CPPI 02/06                          | $8,6 \times 10^6$  | $5,0 \times 10^4$   |
| CPPI 01/07                          | $1,2 \times 10^7$  | $5,0 \times 10^3$   |
| CPPI 02/07                          | $2,0 \times 10^7$  | $5,0 \times 10^4$   |

FONTE: O AUTOR (2005, 2006 E 2007)



## 5.2 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS METODOLOGIAS DE CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS OFICIAL (POUR-PLATE) DA FARMACOPÉIA AMERICANA-USP 29 (2005) E O MÉTODO DA MICRO GOTA OU SEMEA - DURA EM SUPERFÍCIE

### 5.2.1 Suspensões aquosas de esporos

#### 5.2.1.1 Avaliação da determinação de células viáveis totais pelas duas metodologias: *pour-plate* e micro-gota

Os resultados das contagens de colônias nas duas metodologias estudadas, (TABELA 15 e FIGURA 24) foram submetidos a aplicação do Teste F, obtendo-se: F1,5393; p-valor = 0,5075; intervalo de confiança = 0,4142 a 5,7213, demonstrando que não existe diferença estatisticamente significativa entre as duas amostras num nível de confiança de 95%. A aplicação do teste t-Student forneceu: t= 0,4113; p-valor = 0,6851, intervalo de confiança de  $3,22 \times 10^6$  a  $4,8 \times 10^6$ . Concluindo com 95% de confiança, que não há uma diferença significativa nos resultados.

TABELA 15 – RESULTADO DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 POR SEMEADURA POUR-PLATE E DE MICRO-GOTAS NA SUPERFÍCIE DO ÁGAR DE SOJA TRIPTICASEÍNA (TSA)

| Amostra/lote N° | Semeadura Superfície<br>UFC. mL <sup>-1</sup> | Pour-plate<br>UFC. mL <sup>-1</sup> |
|-----------------|---|-------------------------------------|
| 1/Lote 01       | $1,3 \times 10^6$                             | $1,6 \times 10^6$                   |
| 2/Lote02        | $9,2 \times 10^5$                             | $7,9 \times 10^5$                   |
| 3/Lote03        | $1,2 \times 10^6$                             | $1,7 \times 10^6$                   |
| 4/Lote04        | $3,6 \times 10^6$                             | $2,8 \times 10^6$                   |
| 5/Lote05        | $2,1 \times 10^4$                             | $1,0 \times 10^4$                   |
| 6/Lote01A       | $9,3 \times 10^6$                             | $5,6 \times 10^6$                   |
| 7/Lote02A       | $1,6 \times 10^6$                             | $4,8 \times 10^6$                   |
| 8/Lote03A       | $1,3 \times 10^6$                             | $1,4 \times 10^6$                   |
| 9/Lote04A       | $1,2 \times 10^7$                             | $1,4 \times 10^7$                   |
| 10/Lote05A      | $2,0 \times 10^3$                             | $1,3 \times 10^3$                   |
| 11/Lote01B      | $5,7 \times 10^5$                             | $2,1 \times 10^6$                   |
| Média           | $3,96 \times 10^6$                            | $3,16 \times 10^6$                  |
| Variância       | $2,47 \times 10^{13}$                         | $1,61 \times 10^{13}$               |
| Desvio padrão   | $4,97 \times 10^6$                            | $4,01 \times 10^6$                  |

FONTE: O AUTOR ( 2007)



FIGURA 24 – PLACA DE PETRI COM AS COLÔNIAS FORMADAS PELO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM CONTAGEM DE CÉLULAS PELO MÉTODO DA MICROGOTA

FONTE: O autor (2007)

#### 5.2.1.2 Interferência do choque térmico nos resultados obtidos na determinação das células viáveis sem e após tratamento térmico por 15 minutos a 95°C-100°C

Os resultados demonstraram pequenas diferenças. Quando aplicado o Teste F nos resultados obteve-se  $F=1,21$ ,  $p\text{-valor} = 0,84$  e intervalo de confiança = 0,17 a 8,64, demonstrando que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, num nível de confiança de 95%. A aplicação do Teste t-Student forneceu os seguintes valores:  $t = 0,050$ ,  $p\text{-valor} = 0,96$ , intervalo de confiança =  $2,38 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  a  $2,27 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ . Concluindo-se que com 95% de confiança, não há diferença significativa nos resultados.

A média da relação sem tratamento/pós-tratamento foi de  $0,7 \pm 0,2$ , estando o valor dentro da variação da metodologia citada na USP 29, 2006 que é de 0,5 a 3,0 (FIGURA 25 e TABELA 16)

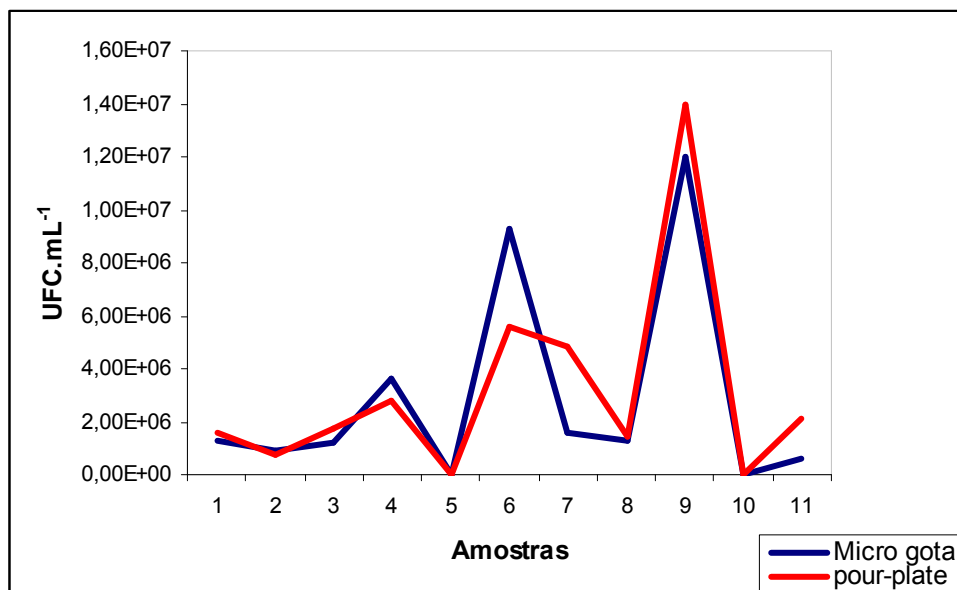


FIGURA 25 - GRÁFICO DA CONTAGEM DE MICROORGANISMOS VIÁVEIS NA SUSPENSÃO DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953  
 FONTE: O autor (2007)

TABELA 16 – RESULTADO DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DAS SUSPENSÕES DE ESPOROS *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO

| Amostra/Lote  | Sem tratamento                  | Após tratamento térmico |                                       |
|---------------|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
|               | térmico<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | UFC.mL <sup>-1</sup>    | Relação S/P<br>(sem trat/ pós- trat*) |
| 1-CPPI-14/01  | 1,70 x 10 <sup>7</sup>          | 2,10 x 10 <sup>7</sup>  | 0,8                                   |
| 2-CPPI-01/03  | 1,40 x 10 <sup>7</sup>          | 3,10 x 10 <sup>7</sup>  | 0,5                                   |
| 3-CPPI-02/03  | 2,00 x 10 <sup>7</sup>          | 3,50 x 10 <sup>7</sup>  | 0,6                                   |
| 4-CPPI-03/03  | 1,30 x 10 <sup>7</sup>          | 2,40 x 10 <sup>7</sup>  | 0,5                                   |
| 5-CPPI-02/05  | 4,80 x 10 <sup>8</sup>          | 4,50 x 10 <sup>8</sup>  | 1,1                                   |
| 6-CPPI-03/05  | 1,90 x 10 <sup>7</sup>          | 3,30 x 10 <sup>7</sup>  | 0,6                                   |
| x(média)      | 9,38 x 10 <sup>7</sup>          | 9,90 x 10 <sup>7</sup>  | 0,7                                   |
| variância     | 3,58 x 10 <sup>16</sup>         | 2,96 x 10 <sup>16</sup> | 0,1                                   |
| desvio padrão | 1,89 x 10 <sup>8</sup>          | 1,72 x 10 <sup>8</sup>  | 0,2                                   |

NOTA: \* TRAT=TRATAMENTO

FONTE: O autor (2007)

Não foram observadas diferenças nas contagens das células viáveis totais, com e sem tratamento térmico com 24 horas e 48 horas de incubação. Porém em 48 horas de incubação observou-se que as colônias ficaram maiores e algumas vezes fundiram-se. O meio incubado por 48 horas apresentou fissuras indicando ressecamento.

## 5.2.2 Indicadores biológicos

### 5.2.2.1 Avaliação da influência do choque térmico na determinação de células viáveis pelas metodologias - *pour plate* e microgota

Avaliando os resultados da TABELA 17 através do Teste F, obteve-se:  $F=0,93$ ;  $p\text{-valor}=0,93$ ; intervalo de confiança = 0,16 a 5,40, demonstrando que não existe diferença estatisticamente significativa entre as duas amostras num nível de confiança de 95%. A aplicação do teste t-Student forneceu:  $t=-0,025$ ;  $p\text{-valor}=0,98$ , intervalo de confiança  $=-3,8 \times 10^5$  a  $3,8 \times 10^5$ . Portanto, observa-se com 95% de confiança, que não há diferença significativa nos resultados entre os dois grupos de amostras. A média da relação sem tratamento/pós-tratamento foi de  $0,8 \pm 0,3$ , estando o valor dentro da variação da metodologia. A FIGURA 26 apresenta o Box-and-Whisker Plot da contagem de microorganismos viáveis no Indicador biológico.

TABELA 17 – RESULTADO DAS CONTAGENS DE COLÔNIAS DOS INDICADORES BIOLÓGICOS PARA ESTERILIZAÇÃO À VAPOR SEM E APÓS TRATAMENTO TÉRMICO

| Amostra/Lote        | Sem tratamento térmico<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | Após tratamento térmico<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | Relação S/P<br>(sem trat/após trat) |
|---------------------|--|---|-------------------------------------|
| 1/G-CPPI-01/03      | $4,30 \times 10^2$                             | $7,20 \times 10^2$                              | 0,6                                 |
| 2/G-CPPI-01/03A     | $3,60 \times 10^3$                             | $6,90 \times 10^3$                              | 0,5                                 |
| 3/G-CPPI-01/03B     | $4,90 \times 10^4$                             | $8,50 \times 10^4$                              | 0,6                                 |
| 4/G-CPPI-02/03      | $5,60 \times 10^2$                             | $1,10 \times 10^3$                              | 0,5                                 |
| 5/CPPI-01/03 granel | $1,10 \times 10^3$                             | $9,50 \times 10^2$                              | 1,2                                 |
| 6/STERIKON          | $7,30 \times 10^5$                             | $8,40 \times 10^5$                              | 0,9                                 |
| 7/STERIKON          | $5,60 \times 10^5$                             | $4,40 \times 10^5$                              | 1,3                                 |
| x(média)            | $1,92 \times 10^5$                             | $1,56 \times 10^5$                              | 0,8                                 |
| variância           | $9,84 \times 10^{10}$                          | $1,06 \times 10^{11}$                           | 0,1                                 |
| desvio padrão       | $3,14 \times 10^5$                             | $3,26 \times 10^5$                              | 0,3                                 |

NOTA: TRAT-TRATAMENTO; UFC – UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS

FONTE: o autor (2007)

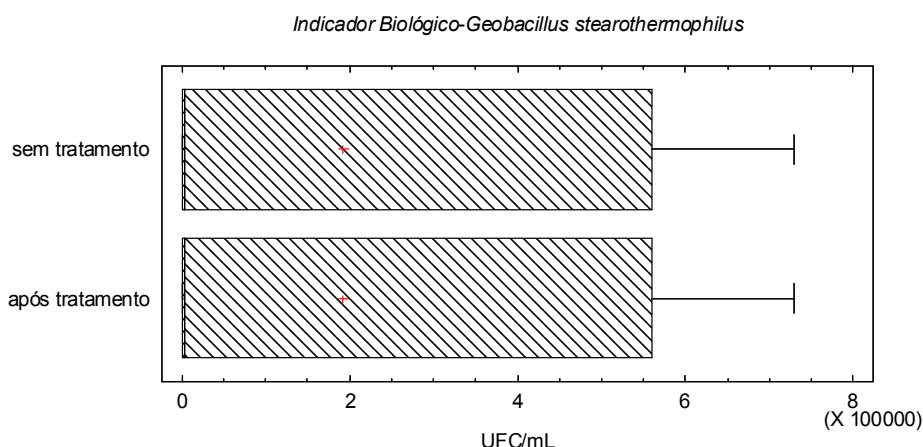


FIGURA 26 - BOX-AND-WHISKER PLOT DA CONTAGEM DE MICROORGANISMOS VIÁVEIS DE INDICADORES BIOLÓGICOS COM *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953  
 FONTE: O autor (2007)

### 5.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM TSB (*TRIPTICASE SOY BROTH*)

Os resultados do número de UFC.mL<sup>-1</sup> obtidos a cada três horas de cultivo estão demonstrados na TABELA 18.

TABELA 18 – QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS OBTIDAS NA CURVA DE CRESCIMENTO DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM TSB

| TEMPO (horas) | UFC.mL <sup>-1</sup>  |
|---------------|-----------------------|
| 0             | 5,9 x 10 <sup>5</sup> |
| 3             | 7,7 x 10 <sup>5</sup> |
| 6             | 2,1 x 10 <sup>7</sup> |
| 9             | 1,9 x 10 <sup>7</sup> |
| 12            | 7,7 x 10 <sup>5</sup> |
| 15            | 8,6 x 10 <sup>5</sup> |
| 18            | 3,8 x 10 <sup>5</sup> |
| 21            | 0,0                   |
| 24            | 0,0                   |

FONTE: O autor (2006)

NOTA: UFC - UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

Na FIGURA 27 visualiza-se a curva de crescimento obtida, onde se observa que as três primeiras horas correspondem à fase lag ou de adaptação do microorganismo às condições de cultivo. A partir da terceira hora, culminando na sexta, obteve-se a fase log (exponencial) de crescimento. Da sexta à nona hora

observou-se a fase estacionária e da nona até a décima segunda hora, aconteceu a fase de declínio, ocorrendo a morte do microorganismo a partir da vigésima primeira hora de incubação. O tempo de geração (duplicação) calculado foi de 0,69 hora correspondendo a 41,4 minutos e a velocidade específica máxima de crescimento, foi de 0,76.

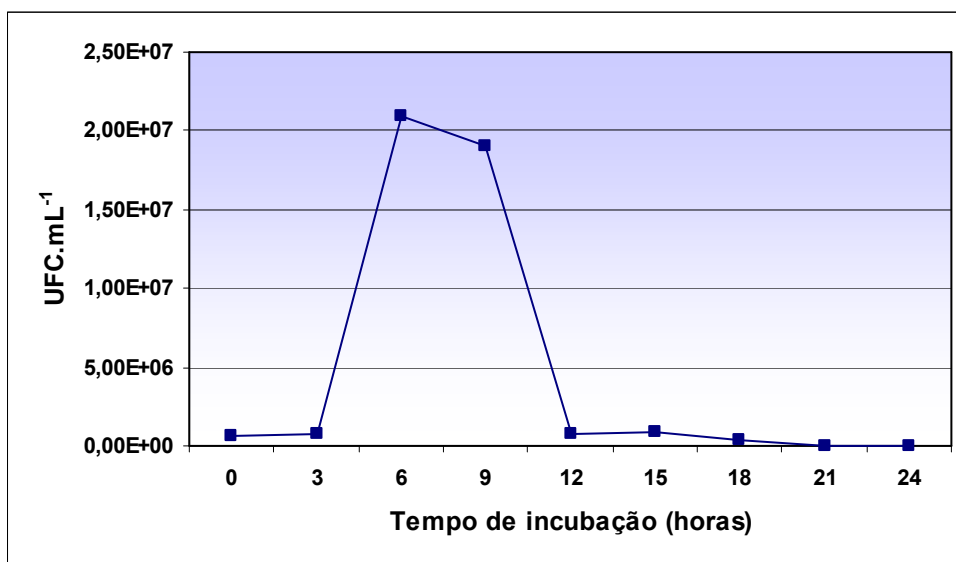


FIGURA 27 –CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM TSB (tripticase soy broth)  
FONTE: O autor (2006)

#### 5.4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MEIOS DE CULTIVO FORMULADOS COM RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGRO-INDUSTRIAIS NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS ÍNTEGROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

##### 5.4.1 Caracterização dos subprodutos/resíduos agroindustriais

A vinhaça de cana-de-açúcar utilizada apresentou aproximadamente 2,0 ° Brix , o melaço de cana de açúcar 77 ° Brix e melaço de soja 75° Brix. .

O resultado da determinação do grau Brix nas quatorze amostras de vinhaça de soja encontram-se na TABELA 19.

TABELA 19 – DETERMINAÇÃO DO GRAU BRIX NOS 14 LOTES DE VINHAÇA DE SOJA

| <b>Amostras</b>      | <b>Leitura<br/>1</b> | <b>Leitura<br/>2</b> | <b>Média</b> |
|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| 01                   | 11,80                | 12,00                | 11,90        |
| 02                   | 9,50                 | 9,50                 | 11,00        |
| 03                   | 12,00                | 12,20                | 12,10        |
| 04                   | 12,00                | 12,00                | 12,00        |
| 05                   | 11,20                | 11,20                | 11,20        |
| 06                   | 11,20                | 11,20                | 11,20        |
| 07                   | 11,00                | 11,00                | 11,00        |
| 08                   | 13,00                | 13,20                | 13,10        |
| 09                   | 13,00                | 13,00                | 13,00        |
| 10                   | 12,80                | 13,00                | 12,90        |
| 11                   | 14,50                | 14,50                | 14,50        |
| 12                   | 15,00                | 15,00                | 15,00        |
| 13                   | 14,50                | 14,50                | 14,50        |
| 14                   | 16,50                | 17,00                | 16,75        |
| <b>Média</b>         | <b>12,71</b>         | <b>12,81</b>         | <b>12,87</b> |
| <b>variância</b>     | <b>3,52</b>          | <b>3,80</b>          | <b>3,10</b>  |
| <b>Desvio padrão</b> | <b>1,88</b>          | <b>1,95</b>          | <b>1,75</b>  |

FONTE: O autor (2007)

As análises realizadas no CEPPA forneceram para o melaço de soja os seguintes resultados: nitrogênio total,0,8g%; açúcares totais,50,8g%; resíduo mineral fixo,9,6g%; gorduras totais,0,3g% e sólidos totais,76,2 g%. Na TABELA 20, são demonstrados os resultados das análises realizadas no CEPPA das amostras dos lotes da vinhaça de soja utilizada.

TABELA 20 – RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS EM AMOSTRAS DE DIFERENTES LOTES DE VINHAÇA DE SOJA

| <b>Análises</b>   | <b>Lote 11</b> | <b>Lote 12</b> | <b>Lote 13</b> | <b>Lote 14</b> | <b>Média</b> | <b>Desvio<br/>padrão</b> | <b>Variância</b> |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------------------|------------------|
| Nº do certificado   | 106542         | 106543         | 106544         | 107749         | ---          | ---                      |                  |
| DBO (mg.L <sup>-1</sup> )   | 160.950,30     | 152.909,30     | 130.341,20     | --             | 148.066,93   | 15.87                    | 251.815.637      |
| DQO (mg.L <sup>-1</sup> )   | 195.600,00     | 192.800,00     | 197.600,00     | --             | 195.333,33   | 2.36                     | 5.565.800        |
| Umidade e<br>substâncias<br>voláteis<br>(g.100 mL <sup>-1</sup> ) | 82,88          | 83,91          | 81,82          | 82,54          | 82,79        | 0,85                     | 0,73             |
| Resíduo mineral<br>fixo (g/mL)                                    | 2,06           | 2,03           | 2,00           | 3,38           | 2,37         | 0,68                     | 0,46             |
| Gordura total<br>(g/mL)   | 5,37           | 8,16           | 2,91           | 1,51           | 4,49         | 2,92                     | 0,17             |
| Proteínas<br>(N x 5,75)<br>(g/100mL)                              | 1,36           | 1,16           | 1,48           | 2,11           | 1,52         | 0,41                     | 0,17             |
| Carboidratos<br>(g/100mL)   | 8,33           | 4,74           | 11,79          | 10,46          | 8,83         | 3,10                     | 9,46             |

FONTE: CEPPA (2007)

A TABELA 21 demonstra os resultados da qualificação e quantificação dos carboidratos determinados por HPLC, nos 14 lotes analisados de vinhaça de soja.

TABELA 21 - QUALIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS POR HPLC NA VINHAÇA DE SOJA

| Amostra          | Estaquiose<br>g% | Rafinose<br>g% | Melibiose<br>g% | Glucose<br>g% | Gal+frutose<br>g% | Totais<br>g% |
|------------------|------------------|----------------|-----------------|---------------|-------------------|--------------|
| 01               | 1,4              | 2,8            | 1,6             | 0,1           | 0,1               | 5,9          |
| 02               | 2,5              | 2,8            | 1,1             | 0,1           | 0,1               | 6,6          |
| 03               | 2,8              | 3,7            | 1,0             | 0,2           | 0,2               | 7,9          |
| 04               | 2,4              | 3,6            | 1,5             | 0,1           | 0,1               | 7,7          |
| 05               | 2,5              | 3,1            | 1,2             | 0,1           | 0,1               | 6,9          |
| 06               | 2,5              | 2,9            | 1,1             | 0,1           | 0,1               | 6,8          |
| 07               | 2,3              | 2,4            | 1,0             | 0,1           | 0,1               | 5,9          |
| 08               | 2,6              | 3,0            | 1,3             | 0,05          | 0,1               | 7,2          |
| 09               | 1,3              | 2,6            | 1,3             | 0,04          | 0,1               | 5,4          |
| 10               | 2,1              | 2,9            | 1,4             | 0,07          | 0,1               | 6,6          |
| 11               | 3,7              | 3,6            | 1,4             | 0,6           | 0,8               | 9,2          |
| 12               | 3,8              | 3,8            | 1,4             | 0,6           | 0,8               | 10,4         |
| 13               | 3,9              | 3,6            | 1,4             | 0,6           | 0,8               | 10,3         |
| 14               | 3,56             | 4,4            | 1,79            | 0,29          | 0,42              | 10,5         |
| <b>média</b>     | <b>2,68</b>      | <b>3,23</b>    | <b>1,24</b>     | <b>0,21</b>   | <b>0,25</b>       | <b>7,46</b>  |
| <b>Variância</b> | <b>0,675</b>     | <b>0,313</b>   | <b>0,052</b>    | <b>0,047</b>  | <b>0,087</b>      | <b>3,081</b> |
| <b>Desvio</b>    |                  |                |                 |               |                   |              |
| <b>padrão</b>    | <b>0,822</b>     | <b>0,560</b>   | <b>0,228</b>    | <b>0,216</b>  | <b>0,295</b>      | <b>1,755</b> |
| <b>%</b>         | <b>34,0</b>      | <b>42,1</b>    | <b>17,1</b>     | <b>2,8</b>    | <b>4,0</b>        | <b>100,0</b> |

FONTE: O autor (2007)

A composição média de carboidratos em 14 amostras de vinhaça de soja determinada por HPLC foi de: 7,46 g%, sendo 2,68 g% de estaquiose, 3,23 g% de rafinose, 1,79 g% de melibiose, 0,21 g% de glucose e 0,25 g% de galactose e frutose.

A porcentagem média de cada um dos açúcares foi calculada em: 34,0% de estaquiose, 42,1% de rafinose, 17,1% de melibiose, 2,8% de glucose e 4,0% de galactose+frutose (FIGURA 28).



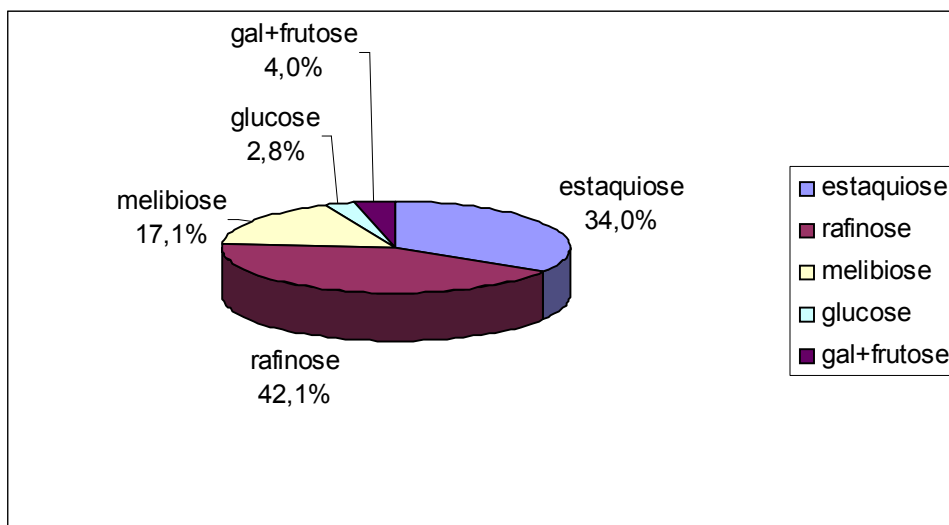


FIGURA 28 - PORCENTAGEM MÉDIA DOS CARBOIDRATOS DETERMINADOS POR HPLC EM VINHAÇA DE SOJA

#### 5.4.2 Avaliação da capacidade germinativa dos meios de cultura produzidos com vinhaças de soja (VS) e de cana-de-açúcar (VC) e melaços de soja (MS) e de cana-de-açúcar (MC)

##### 5.4.2.1 Grupo COM ESPOROS

Foram testadas 25 diferentes formulações de meios com o melaço e vinhaça de soja e cana-de-açúcar em diferentes diluições como substrato. Os resultados obtidos com os meios estudados encontram-se na TABELA 22.

##### a) Viabilidade

Foram considerados satisfatórios, os resultados que apresentaram todos os frascos positivos (meios amarelos) após o tempo e incubação.

Os meios testados com VS e VC apresentaram resultados satisfatórios para o teste de viabilidade nas concentrações analisadas (1:25, 1:40, 1:50, 1:70, 1:90, 1:100) ou seja, os frascos apresentaram alteração da coloração inicial violeta para amarelo com turbidez, com 24 horas de incubação de maneira semelhante ao meio controle.

Os meios MS e MC nas concentrações 1:25, 1:50 e 1:100, apresentaram resultados insatisfatórios para o teste de viabilidade, pois nem todos os frascos incubados apresentaram a mudança de coloração do meio, indicando ausência de

germinação dos esporos até o sétimo dia de incubação. Os meios MS nas concentrações 1:200, 1:400 e 1:600 mostraram-se satisfatórios para o teste de viabilidade, mudando a coloração dos frascos após 48 horas de incubação. Os meios MC nas concentrações de 1:200, 1:400 e 1:600 apresentaram alteração na cor de violeta para amarelo, porém não houve o surgimento de turbidez. Foram feitos esfregaços e a observação das lâminas coradas pelo método de Gram, mostrou a presença de esporos e poucos bacilos, sendo o resultado considerado insatisfatório para viabilidade.

b) Viabilidade após cinco minutos de autoclavação - tempo de sobrevivência (TS)

Para o resultado ser considerado satisfatório, todos os frascos devem apresentar germinação dos esporos, com alteração da coloração dos meios de violeta para amarelo e presença de turbidez, transcorrido o período de incubação de até sete dias.

Os resultados foram satisfatórios para os meios VS e VC, ocorrendo alteração da coloração inicial, de maneira semelhante ao controle E-CPPI em 24 horas.

Os meios MS e MC nas concentrações de 1:25, 1:50 e 1:100 apresentaram resultados insatisfatórios, pois nem todos os frascos apresentaram alteração na coloração até o sétimo dia de incubação. Foram obtidos resultados satisfatórios para os meios MS nas concentrações de 1:200, 1:400 e 1:600, observado pela alteração da cor dos meios de violeta para amarelo turvo, o mesmo não ocorrendo com os meios MC nas mesmas concentrações, pois houve alteração na coloração, porém sem a presença de turbidez, sendo considerados os resultados insatisfatórios.

c) Viabilidade após quinze minutos de autoclavação - tempo médio de Morte (TM)

Considerou-se como satisfatório, o resultado em que não houve alteração da coloração do meio, demonstrando ausência de crescimento microbiano.

Os meios VS, VC, MS e MC inoculados com esporos não apresentaram desenvolvimento microbiano, permanecendo na coloração violeta após 7 dias de incubação, da mesma maneira que o controle Esteriteste-CPPI.

TABELA 22 – RESULTADOS DOS TESTES REALIZADOS NOS MEIOS COM RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA NOS MEIOS COM ESPOROS

| Teste | Meio                  | Viabilidade | Autoclavação<br>(5 minutos) | Autoclavação<br>(15 minutos) | Resultado           |
|-------|-----------------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|
| 1     | vinhaça de soja 1:25  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 2     | vinhaça de soja 1:40  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 3     | vinhaça de soja 1:50  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 4     | vinhaça de soja 1:70  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 5     | vinhaça de soja 1:90  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 6     | vinhaça de soja 1:100 | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 7     | vinhaça de cana 1:25  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 8     | vinhaça de cana 1:40  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 9     | vinhaça de cana 1:50  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 10    | vinhaça de cana 1:70  | 10+         | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 11    | vinhaça de cana 1:90  | 10 +        | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 12    | vinhaça de cana 1:100 | 10 +        | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 13    | Melaço de soja 1:25   | 2+8-        | 2+8-                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 14    | Melaço de soja 1:50   | 2+8-        | 2+8-                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 15    | Melaço de soja 1:100  | 7+3-        | 7+3-                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 16    | Melaço de soja 1:200  | 10 +        | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 17    | Melaço de soja 1:400  | 10 +        | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 18    | Melaço de soja 1:600  | 10 +        | 10+                         | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 19    | Melaço de cana 1:25   | 1+9-        | 1+9-                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 20    | Melaço de cana 1:50   | 2+8-        | 2+8-                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 21    | Melaço de cana 1:100  | 2+8-        | 2+8-                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 22    | Melaço de cana 1:200  | *10+        | *10+                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 23    | Melaço de cana 1:400  | *10+        | *10+                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 24    | Melaço de cana 1:600  | *10+        | *10+                        | 10-                          | INSATISFATÓRIO      |
| 25    | Meio controle (CPPI)  | 10 +        | 10 +                        | 10-                          | <b>SATISFATÓRIO</b> |

FONTE: O AUTOR (2007)

NOTA: \* FRASCOS AMARELOS SEM TURBIDEZ

#### 5.4.2.2 Grupo SEM ESPOROS

##### a) Pesquisa de contaminantes

Os resultados para pesquisa de contaminantes foram satisfatórios, pois não foi observada presença de fungos, leveduras e bactérias nos meios estudados.

##### b) Verificação da capacidade dos meios (VS, VC, MS, MC) em germinar esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 após esterilização adicional de 15 minutos

O meio de cultivo deve manter suas características germinativas após o tempo adicional de esterilização, ou seja, deve promover o desenvolvimento

microbiano visualizado pela alteração da cor de violeta (-) para amarelo com turbidez (+).

Todos os meios VS nas diluições estudadas (1:25; 1:40; 1:50; 1:70; 1:90 e 1:100) apresentaram resultados satisfatórios quando inoculados com 100 UFC e 1000 UFC de esporos. Todos os frascos demonstraram alteração na coloração inicial do meio de violeta para amarelo com turbidez, de maneira semelhante ao meio controle Esteriteste-CPPI, após o período de 7 dias de incubação. Os meios VC nas concentrações estudadas (1:25; 1:40; 1:50; 1:70; 1:90 e 1:100), não demonstraram resultados satisfatórios, pois apesar de terem apresentado coloração amarela em todos os frascos, não houve turvação.

Todos os meios MS e MC apresentaram resultados insatisfatórios, pois não houve alteração da coloração inicial do meio, em 100% das amostras após o período de sete dias de incubação.

Nos frascos que apresentaram meios com coloração amarela sem turbidez, foram feitos esfregaços colorados pelo método de Gram, sendo observados raros bacilos. Os resultados da verificação dos meios encontram-se compilados na tabela 23.

TABELA 23 – RESULTADOS DA VERIFICAÇÃO DOS MEIOS ESTUDADOS SEM ESPOROS

| Teste | Meio                  | 100        | 1 000      | Resultado           |
|-------|-----------------------|------------|------------|---------------------|
|       |                       | UFC/frasco | UFC/frasco |                     |
| 1     | vinhaça de soja 1:25  | 10+        | 10+        | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 2     | vinhaça de soja 1:40  | 10+        | 10+        | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 3     | vinhaça de soja 1:50  | 10+        | 10+        | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 4     | vinhaça de soja 1:70  | 10+        | 10+        | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 5     | vinhaça de soja 1:90  | 10+        | 10+        | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 6     | vinhaça de soja 1:100 | 10+        | 10+        | <b>SATISFATÓRIO</b> |
| 7     | vinhaça de cana 1:25  | *10+       | *10+       | INSATISFATÓRIO      |
| 8     | vinhaça de cana 1:40  | *10+       | *10+       | INSATISFATÓRIO      |
| 9     | vinhaça de cana 1:50  | *10+       | *10+       | INSATISFATÓRIO      |
| 10    | vinhaça de cana 1:70  | *10+       | *10+       | INSATISFATÓRIO      |
| 11    | vinhaça de cana 1:90  | *10+       | *10+       | INSATISFATÓRIO      |
| 12    | vinhaça de cana 1:100 | *10+       | *10+       | INSATISFATÓRIO      |
| 13    | Melaço de soja 1:25   | 1+9-       | 2+8-       | INSATISFATÓRIO      |
| 14    | Melaço de soja 1:50   | 2+8-       | 2+8-       | INSATISFATÓRIO      |
| 15    | Melaço de soja 1:100  | 3+7-       | 4+6-       | INSATISFATÓRIO      |
| 16    | Melaço de soja 1:200  | 3+7-       | 5+5-       | INSATISFATÓRIO      |
| 17    | Melaço de soja 1:400  | 5+5-       | 5+5-       | INSATISFATÓRIO      |
| 18    | Melaço de soja 1:600  | 6+4-       | 9+1-       | INSATISFATÓRIO      |
| 19    | Melaço de cana 1:25   | 10-        | 1+9-       | INSATISFATÓRIO      |
| 20    | Melaço de cana 1:50   | 1+9-       | 2+8-       | INSATISFATÓRIO      |
| 21    | Melaço de cana 1:100  | 2+8-       | 3+7-       | INSATISFATÓRIO      |
| 22    | Melaço de cana 1:200  | 2+8-       | 3+7-       | INSATISFATÓRIO      |
| 23    | Melaço de cana 1:400  | 4+6-       | 5+5-       | INSATISFATÓRIO      |
| 24    | Melaço de cana 1:600  | 6+4-       | 7+3-       | INSATISFATÓRIO      |
| 25    | Meio controle (CPPI)  | 10+        | 10+        | <b>SATISFATÓRIO</b> |

FONTE: o autor (2007)

NOTA: UFC – unidades formadoras de colônias; \* frascos amarelos sem turbidez

Apenas os meios produzidos com vinhaça de soja nas concentrações estudadas (1:25, 1:40, 1:50, 1:70, 1:90 e 1:100) apresentaram resultados satisfatórios para todos os ensaios, sendo o único meio com comportamento semelhante ao padrão CPPI.

### 5.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROMOÇÃO DA GERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR, DE MEIOS DE CULTIVO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os meios (caldos) com vinhaça de soja 1:70 (VS-1:70) e Padrão (E-CPPI) propiciaram resultados semelhantes quanto à viabilidade, quando os esporos foram submetidos a tempos crescentes de autoclavação: 5 minutos, 7,5 minutos e 10 minutos (TABELA 24).

TABELA 24 - RESULTADO DA VIABILIDADE NOS MEIOS PARA RECUPERAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR

| Tempo de autoclavação<br>Meio | Sem autoclavar | 5 minutos | 7,5 minutos | 10 minutos |
|-------------------------------|----------------|-----------|-------------|------------|
| VS-1:70                       | positivo       | positivo  | Positivo    | Negativo   |
| E-CPPI                        | positivo       | positivo  | Positivo    | Negativo   |

FONTE: O autor (2007)

NOTA: são considerados positivos os frascos com crescimento microbiano e conseqüente alteração da cor de violeta para amarelo

Posteriormente, na quantificação dos esporos sobreviventes ao tratamento térmico, observou-se que o meio VS 1:70 modificado apresentou-se leitoso e com certa umidade na superfície do ágar, dificultando a contagem pois as colônias formadas não ficaram isoladas. Os meios TSA, das marcas Himédia e Merck não favoreceram o desenvolvimento de colônias com os esporos sobreviventes. O meio geleificado Esteriteste-CPPI modificado (E-CPPI modificado) apresentou colônias bem formadas e independentes, possibilitando a contagem. O resultado foi realizado com a média das duas placas, após leitura com 24 horas de incubação.

A TABELA 25 contém os resultados da quantificação dos esporos suspensos no meio (caldo de revelação) composto por vinhaça de soja 1:70, e danificados pelos tempos 5 minutos, 7,5 minutos e 10 minutos de autoclavação. A semeadura foi realizada nos meios TSA-HIMÉDIA, TSA-MERCK, ágar VS 1:70 modificado e ágar E-CPPI modificado

A TABELA 26 contém os mesmos resultados, porém referentes aos esporos suspensos no meio (caldo de germinação) E-CPPI.

TABELA 25– RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermo - philus* ATCC 7953 PELO MÉTODO DA MICROGOTA, UTILIZANDO MEIO E-CPPI MODIFICADO, TSA (MARCA HIMÉDIA E MERCK) E VS 1:70 MODIFICADO. MEIO DE RECUPERAÇÃO: VINHAÇA 1:70

| Tempo de autoclavação | Sem autoclavar       | 5 minutos            | 7,5 minutos          | 10 minutos           |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Meio                  | UFC.mL <sup>-1</sup> | UFC.mL <sup>-1</sup> | UFC.mL <sup>-1</sup> | UFC.mL <sup>-1</sup> |
| TSA-HIMÉDIA           | 4,8x 10 <sup>4</sup> | ----                 | ----                 | ----                 |
| TSA-MERCK             | 4,5x 10 <sup>4</sup> | ----                 | ----                 | ----                 |
| VS 1:70 mod           | 4,2x 10 <sup>4</sup> | 4,7x 10 <sup>4</sup> | ----                 | ----                 |
| E-CPPI mod            | 4,4x 10 <sup>4</sup> | 4,1x 10 <sup>4</sup> | 4,0x 10 <sup>3</sup> | ----                 |

FONTE: O AUTOR (2007)

TABELA 26 – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermo - philus* ATCC 7953 PELO MÉTODO DA MICRO-GOTA, UTILIZANDO MEIO ESTERITESTE-CPPI MODIFICADO, TSA (MARCA HIMÉDIA E MERCK) E VS 1:70 MODIFICADO. MEIO DE RECUPERAÇÃO: ESTERITESTE-CPPI

| Tempo de autoclavação | Sem autoclavar       | 5 minutos            | 7,5 minutos          | 10 minutos           |
|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Meio                  | UFC.mL <sup>-1</sup> | UFC.mL <sup>-1</sup> | UFC.mL <sup>-1</sup> | UFC.mL <sup>-1</sup> |
| TSA-HIMÉDIA           | 4,8x 10 <sup>4</sup> | ----                 | ----                 | ----                 |
| TSA-MERCK             | 5,1x 10 <sup>4</sup> | ----                 | ----                 | ----                 |
| VS 1:70 mod           | 8,9x 10 <sup>4</sup> | 427x 10 <sup>3</sup> | 6,0x 10 <sup>2</sup> | ----                 |
| E-CPPI mod            | 5,6x 10 <sup>4</sup> | 8,8x 10 <sup>3</sup> | 5,0x 10 <sup>2</sup> | ----                 |

FONTE: O AUTOR (2007)

O meio E-CPPI modificado, foi satisfatório na recuperação dos esporos danificados pelo calor para os dois meios de germinação de esporos analisados, estando os resultados compatíveis com o crescimento no “pool”.

O meio VS 1:70 modificado, foi satisfatório para a quantificação dos esporos viáveis após exposição a vários tempos de autoclavação, inoculados no meio de recuperação de esporos E-CPPI. Entretanto, não foi observado bom resultado para o meio VS 1:70, pois houve viabilidade (sobrevivência dos esporos) com 7,5 minutos de autoclavação (verificada pelos tubos do “pool”), porém, os esporos sobreviventes não germinaram no meio geleificado.

Com os meios TSA das marcas Merck e Himédia foi possível quantificar os esporos íntegros, porém não os danificados pelo calor.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DOS COMPONENTES DO MEIO DE CULTIVO NA GERMINAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* DANIFICADOS PELO CALOR

### 5.6.1 Vinhaça de soja

Todas as diluições estudadas da vinhaça de soja (1:25; 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 e 1:100), apresentaram resultados satisfatórios para o teste de viabilidade, apresentando mudança da cor do meio de violeta para amarelo com turbidez nos dez frascos de cada lote testado já nas primeiras 24 horas de incubação (FIGURA 29).

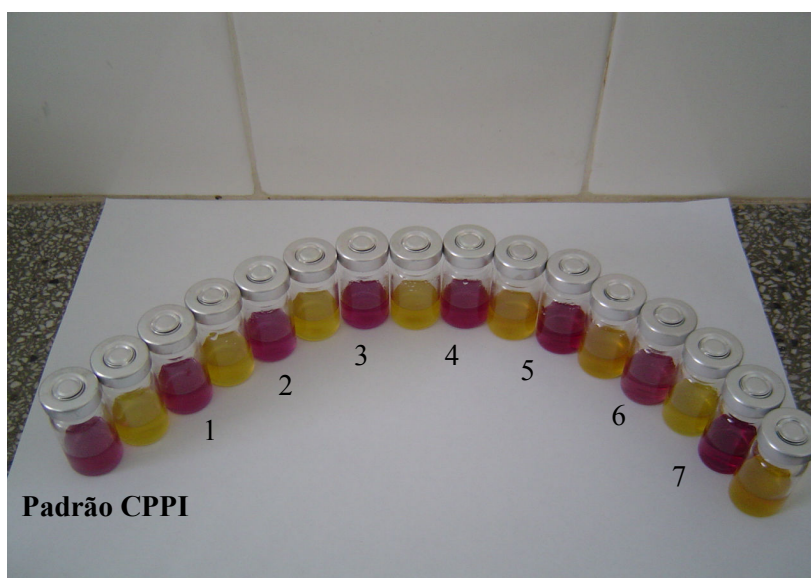


FIGURA 29 – AMOSTRAS DE FRASCOS COM CRESCIMENTO POSITIVOS (AMARELOS) E NEGATIVOS (VIOLETA) DOS MEIOS: padrão-CPPI (CONTROLE) E MEIOS VINHAÇA DE SOJA LOTES: 1-(1:25); 2-(1:40); 3-(1:50); 4-(1:60); 5-(1:70); 6-(1:80) E 7-(1:90)  
FONTE: O autor (2007)

Os resultados com os valores médios obtidos para  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , TS, TM e  $U_{\text{SK}}$  em todas as diluições estudadas e do padrão CPPI (controle) estão descritos na TABELA 27.

A concentração de 1:25 apresentou resultados insatisfatórios, ficando os valores médios de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  em 1,2 minutos,  $U_{\text{SK}}$  em 5,7 minutos, TS em 2,8 minutos e TM em 10 minutos, portanto, abaixo do recomendado.

TABELA 27 – DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  E  $U_{\text{SK}}$  DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, SUSPENSOS NOS MEIOS PRODUZIDOS COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE VINHAÇA DE SOJA

| Meio        | $D_{121^{\circ}\text{C}}$<br>(minutos) | $U_{\text{SK}}$<br>(minutos) | TS<br>(minutos) | TM<br>(minutos) | Resultado           |
|-------------|--|------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| 1:25        | $1,2 \pm 0,35$                         | $5,7 \pm 1,58$               | 2,8             | 10,0            | Insatisfatório      |
| 1:40        | $1,7 \pm 0,24$                         | $9,2 \pm 1,35$               | 3,7             | 13,9            | Insatisfatório      |
| 1:50        | $2,1 \pm 0,31$                         | $9,6 \pm 1,39$               | 4,4             | 17,0            | insatisfatório      |
| 1:60        | $2,9 \pm 0,43$                         | $12,7 \pm 2,58$              | 6,3             | 23,7            | <b>satisfatório</b> |
| 1:70        | $2,9 \pm 0,53$                         | $12,7 \pm 2,05$              | 6,6             | 23,9            | <b>satisfatório</b> |
| 1:80        | $2,4 \pm 0,73$                         | $10,2 \pm 1,98$              | 5,3             | 19,7            | <b>satisfatório</b> |
| 1:90        | $2,4 \pm 0,48$                         | $10,9 \pm 1,85$              | 5,4             | 19,8            | <b>satisfatório</b> |
| 1:100       | -                                      | --                           | --              | --              | insatisfatório      |
| Padrão CPPI | $2,6 \pm 0,51$                         | $11,6 \pm 2,28$              | 5,8             | 21,4            | <b>satisfatório</b> |

FONTE: O autor (2007)

Os meios VS nas concentrações de 1:40 até 1:90, apresentaram valores médios de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , superiores a 1,5 minutos, portanto satisfatórios.

As concentrações 1:40 e 1:50 apresentaram valores insatisfatórios para TS (abaixo de 4,5 minutos), porém dentro do mínimo recomendado para TM (acima de 13,5 minutos).

Para os valores de TS, foram obtidos resultados satisfatórios nas concentrações 1:60, 1:70, 1:80 e 1:90.

As concentrações 1:60 e 1:70 apresentaram respectivamente os resultados de 6,3 minutos e 6,6 minutos para TS, 23,7 minutos e 23,9 minutos para TM. Sendo os valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  (2,9 minutos) e  $U_{\text{SK}}$  (12,7 minutos) iguais para as duas concentrações. Estes resultados foram superiores aos padrão E-CPPI (controle) em todos os parâmetros.

A concentração 1:100 apresentou resultado insatisfatório, pois não apresentou 100% de sobrevivência dos esporos nos frascos submetidos a cinco minutos de autoclavação, não permitindo a determinação dos valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ,  $U_{\text{SK}}$ , TS e TM (FIGURA 30).



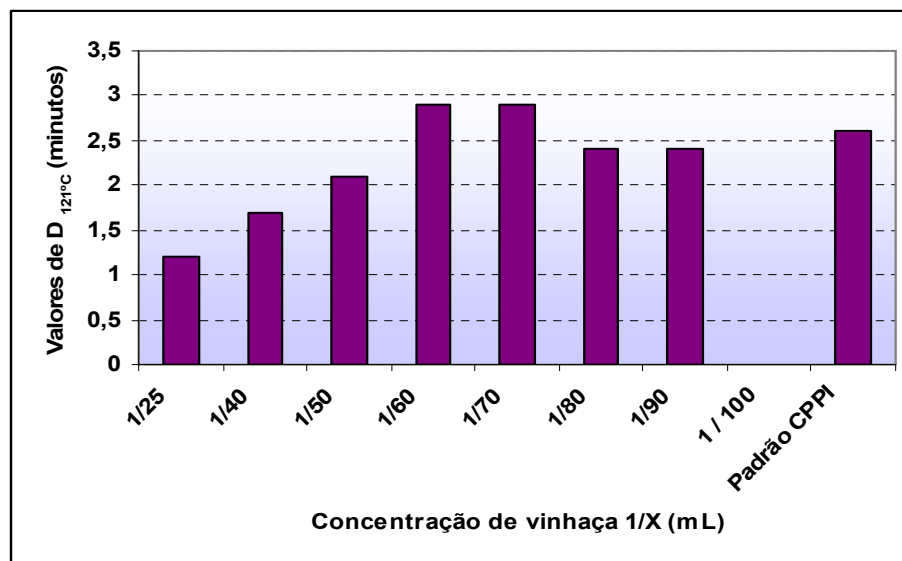


FIGURA 30 - VALORES MÉDIOS DE  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* SUSPENSOS NOS MEIOS PRODUZIDOS COM DIVERSAS DILUIÇÕES DA VINHAÇA DE SOJA

#### 5.6.2 Extrato de leveduras

Todos os meios compostos por vinhaça de soja na concentração de 1:70 acrescidos de diversas concentrações de extrato de leveduras apresentaram:

- viabilidade satisfatória após 24 horas de incubação, ou seja, houve mudança na coloração dos frascos de violeta para amarelo turvo, indicando a germinação dos esporos.
- resultados satisfatórios quando submetidos aos testes para determinação dos valores de  $U_{SK}$ ,  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , tempo de sobrevivência (TS) e tempo de morte (TM), com resultados dentro dos parâmetros exigidos pela USP 29 (2006).

Os valores médios de  $U_{SK}$ , TS, TM e  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  obtidos nos testes realizados com os meios: vinhaça de soja (VS 1:70), lote 14, na diluição de 1:70, amido solúvel 0,1g%, púrpura de bromocresol 0,001g%, cloreto de cálcio 0,0018g% acrescido de várias concentrações de extrato de leveduras-EL (0,0g%, 0,05g%, 0,1g%, 0,2g%, 0,4g%, 0,8g% e 1,0g%) e o meio controle E-CPPI estão demonstrados na TABELA 28. Estes resultados foram considerados satisfatórios para os meios que apresentaram resultados de todos os itens estudados dentro dos padrões

estabelecidos pela USP 29 (2006):  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , acima de 1,5 minutos;  $U_{\text{SK}}$  entre 8 minutos e 15 minutos; TS acima de 4,5 minutos e TM acima de 13,5 minutos.

TABELA 28 – VALORES DE  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ,  $U_{\text{SK}}$ , TS e TM EM MEIOS COM VINHAÇA DE SOJA (1:70) COM DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURAS

| Meio<br>Vinhaça de soja 1:70/extrato de<br>leveduras | $D_{121^{\circ}\text{C}}$<br>(minuto) | $U_{\text{SK}}$<br>(minuto) | TS<br>(minuto) | TM<br>(minuto) | Conclusão    |
|--|---------------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|--------------|
| VS-1:70/0,0g%  | 1,9                                   | 9,3                         | 5,1            | 16,4           | satisfatório |
| VS-1:70/0,05g%                                       | 1,9                                   | 8,8                         | 4,8            | 16,4           | satisfatório |
| VS-1:70/0,1g%  | 2,0                                   | 8,6                         | 4,7            | 16,9           | satisfatório |
| VS-1:70/0,2g%  | 2,3                                   | 9,8                         | 5,5            | 19,2           | satisfatório |
| VS-1:70/0,4g%  | 2,7                                   | 10,9                        | 6,4            | 22,3           | satisfatório |
| VS-1:70/0,8g%  | 3,2                                   | 13,4                        | 7,5            | 26,9           | satisfatório |
| VS-1:70/1,0g%  | 2,2                                   | 9,8                         | 5,2            | 18,4           | satisfatório |
| PADRÃO   | 2,3                                   | 10,6                        | 5,4            | 19,0           | satisfatório |

FONTE: O autor (2007)

NOTA:  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  – tempo de termodestruição;  $U_{\text{SK}}$  – tempo médio de morte; TS-tempo de sobrevivência; TM-tempo de morte

Os resultados (FIGURA 31) demonstraram que o extrato de leveduras na concentração de 0,8 g% apresentou o melhor valor médio de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , ficando superior até mesmo ao meio padrão CPPI.

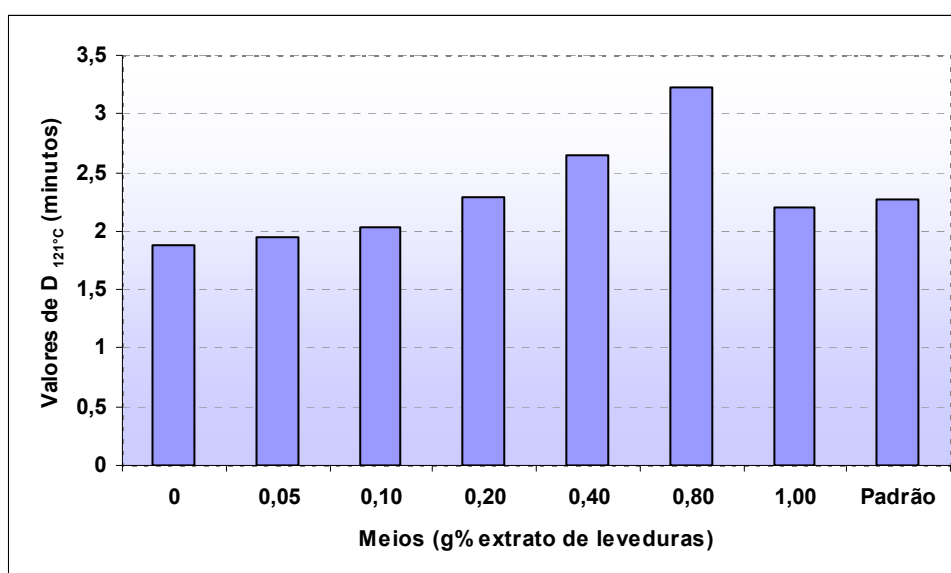


FIGURA 31 - VALORES DE  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  EM MEIOS COM VINHAÇA DE SOJA (1:70) ACRESCIDAS DE DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURAS

FONTE: O autor (2007)

### 5.6.3 Amido

Os resultados obtidos para a determinação da resistência térmica em esporos suspensos nos meios VS+EL (vinhaça de soja + extrato de leveduras) 1:70 com e sem 0,1g% de amido e o padrão E-CPPI (controle), encontram-se na TABELA 29.

TABELA 29 – VALORES DE  $U_{SK}$ ,  $D_{121^{\circ}C}$ , TS E TM PARA ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* SUSPENSOS NOS MEIOS VS+EL SEM E COM AMIDO E O MEIO CONTROLE E-CPPI

| MEIO                 | $U_{SK}$<br>(minutos) | $D_{121^{\circ}C}$<br>(minutos) | TS<br>(minutos) | TM<br>(minutos) |
|----------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| VS+EL 1:70 SEM AMIDO | 12,1±0,9              | 2,4±0,2                         | 6,6             | 21,2            |
| VS+EL 1:70 COM AMIDO | 12,7±0,8              | 2,6±0,2                         | 6,9             | 22,3            |
| E-CPPI (controle)    | 13,8±0,9              | 2,8±0,2                         | 7,5             | 24,2            |

FONTE: O autor (2008)

O resultado para a pesquisa de atividade amilásica revelou que o *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, possui capacidade de metabolizar o amido, conforme pode ser visualizado na FIGURA 32. Porém, este fato não interferiu na determinação da termorresistência dos esporos estudados, pois não houve diferença significativa entre os valores de  $D_{121^{\circ}C}$  obtidos no meio com e no meio sem amido.



FIGURA 32 –TESTE DE VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

FONTE: O autor (2008)

#### 5.6.4 Cálcio

A ausência do cloreto de cálcio provocou um decréscimo na germinação dos esporos danificados pelo calor, diminuindo o valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{sk}$ . Verificou-se que o  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  passou de  $2,76 \pm 0,19$  minutos para  $1,73 \pm 0,29$  minutos e o  $U_{sk}$  de  $13,65 \pm 0,94$  minutos abaixou para  $8,55 \pm 0,33$  minutos respectivamente no meio com e no meio sem cloreto de cálcio.

A viabilidade dos esporos foi satisfatória nos dois meios testados, ocorrendo alteração na coloração do meio em 24 horas de incubação.

#### 5.6.5 pH

Os resultados das médias obtidas para  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ,  $U_{sk}$ , TS e TM no meio VS + EL 1:70 com diferentes pHs estão compilados na TABELA 30.

TABELA 30 -  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ,  $U_{sk}$ , TS e TM DE ESPOROS DE *Geobacillus steaorothermophilus* SUSPENSOS NO MEIO VS + EL 1:70 COM DIVERSOS pHs

| MEIO | pH  | $D_{121^{\circ}\text{C}}$<br>(minutos) | $U_{sk}$<br>(minutos) | TS<br>(minutos) | TM<br>(minutos) |
|------|-----|--|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 1    | 6,0 | $1,2 \pm 0,15$                         | $6,0 \pm 0,66$        | 3,2             | 10,7            |
| 2    | 6,3 | $1,8 \pm 0,18$                         | $8,5 \pm 0,56$        | 4,4             | 15,4            |
| 3    | 6,6 | $1,8 \pm 0,24$                         | $8,7 \pm 0,58$        | 4,7             | 15,5            |
| 4    | 6,9 | $2,9 \pm 0,46$                         | $13,4 \pm 1,1$        | 6,9             | 24,4            |
| 5    | 7,1 | $3,3 \pm 0,40$                         | $16,0 \pm 0,96$       | 8,5             | 28,5            |
| 6    | 7,3 | $3,4 \pm 0,29$                         | $16,2 \pm 0,70$       | 8,6             | 28,9            |

FONTE: O autor (2008)

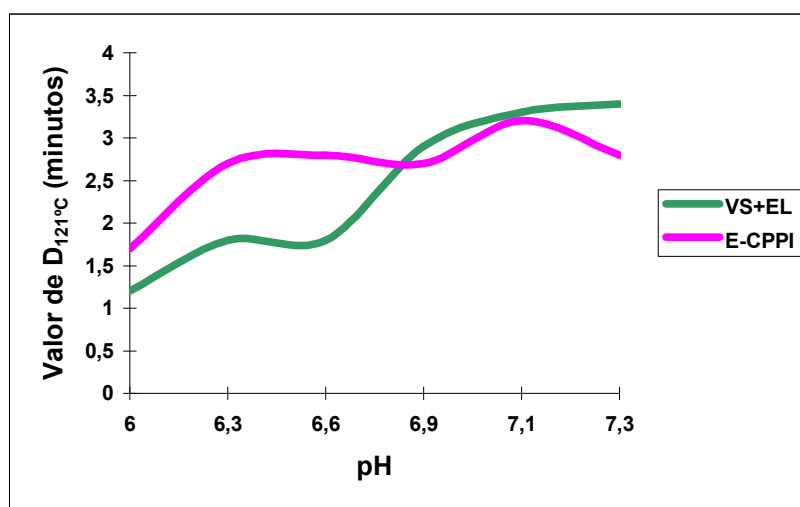
Os valores obtidos do  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ,  $U_{sk}$ , TS e TM dos esporos suspensos no meio padrão CPPI com diferentes pHs, encontra-se na TABELA 31.

TABELA 31 -  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ,  $U_{\text{SK}}$ , TS e TM DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* SUSPENSOS NO MEIO CONTROLE E-CPPI COM DIFERENTES pHs

| MEIO | pH  | $D_{121^{\circ}\text{C}}$<br>(minutos) | $U_{\text{SK}}$<br>(minutos) | TS<br>(minutos) | TM<br>(minutos) |
|------|-----|--|------------------------------|-----------------|-----------------|
| 1    | 6,0 | $1,7 \pm 0,3$                          | $8,7 \pm 0,8$                | 4,7             | 16,9            |
| 2    | 6,3 | $2,7 \pm 0,4$                          | $13,5 \pm 0,9$               | 7,3             | 26,3            |
| 3    | 6,6 | $2,8 \pm 0,3$                          | $13,7 \pm 0,7$               | 7,4             | 23,9            |
| 4    | 6,9 | $2,7 \pm 0,5$                          | $13,5 \pm 0,7$               | 7,3             | 23,6            |
| 5    | 7,1 | $3,2 \pm 0,2$                          | $16,0 \pm 0,5$               | 8,7             | 27,9            |
| 6    | 7,3 | $2,8 \pm 0,2$                          | $13,7 \pm 0,5$               | 7,4             | 23,9            |

FONTE: O autor (2008)

A variação do pH de 6,0 para 7,3 acarretou um aumento gradativo no valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  no meio VS+EL 1:70, demonstrando a interferência da acidez na determinação da termorresistência dos esporos. O mesmo aumento no valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  foi observado no meio E-CPPI (controle) até o pH 7,1, porém, quando este meio teve seu pH aumentado para 7,3 houve um decréscimo (FIGURA 33).

FIGURA 33 – RELAÇÃO ENTRE O pH E O VALOR DE  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM MEIO E-CPPI E VS+EL

### 5.7 CINÉTICA DA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 EM MEIO COM RESÍDUO AGRO INDUSTRIAL- VINHAÇA DE SOJA (VS) E TRIPTICASE SOY BROTH (TSB)

Os resultados das determinações das células viáveis totais, bacilos, esporos, pH e alteração da coloração nos frascos dos meios: 1 (VS 1:70-sem centrifugar), 2

(VS 1:70-centrifugada) e 3 (padrão E-CPPI) respectivamente, durante a cinética de germinação dos esporos estão demonstrados nas TABELAS 32, 33 e 34.

TABELA 32 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (ESPOROS E BACILOS) E pH EM DIFERENTES TEMPOS NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO 1 (VINHAÇA DE SOJA A 1:70 SEM CENTRIFUGAR)

| Tempo de incubação<br>(horas) | Bacilos viáveis<br>totais<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | Esporos viáveis<br>totais<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | pH   | Coloração<br>dos frascos |
|-------------------------------|---|---|------|--------------------------|
| 0                             | -   | 2,2 x 10 <sup>4</sup>                             | 6,76 | violeta                  |
| 3                             | 6,8 x 10 <sup>3</sup>                             | -   | 6,72 | violeta                  |
| 6                             | -   | -   | 6,06 | violeta                  |
| 9                             | 2,8 x 10 <sup>7</sup>                             | -   | 5,26 | amarelo                  |
| 12                            | 9,4 x 10 <sup>6</sup>                             | -   | 5,03 | amarelo                  |
| 15                            | -   | 1,8 x 10 <sup>4</sup>                             | 4,98 | amarelo                  |
| 18                            | -   | 1,2 x 10 <sup>4</sup>                             | 5,04 | amarelo                  |
| 21                            | -   | 4,8 x 10 <sup>3</sup>                             | 5,02 | amarelo                  |
| 24                            | -   | 2,4 x 10 <sup>3</sup>                             | 5,02 | amarelo                  |

FONTE: O autor (2007)

TABELA 33 – CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS) E pH EM DIFERENTES TEMPOS NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO 2 (VS A 1:70-CENTRIFUGADA)

| Tempo de incubação<br>(horas) | Bacilos viáveis<br>totais<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | Esporos viáveis<br>totais<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | pH   | Coloração<br>dos frascos |
|-------------------------------|---|---|------|--------------------------|
| 0                             | -   | 2,4 x 10 <sup>4</sup>                             | 6,79 | violeta                  |
| 3                             | 2,6 x 10 <sup>6</sup>                             | -   | 6,75 | violeta                  |
| 6                             | 1,3 x 10 <sup>7</sup>                             | -   | 6,08 | violeta                  |
| 9                             | 3,4 x 10 <sup>7</sup>                             | -   | 5,24 | amarelo                  |
| 12                            | 2,1 x 10 <sup>6</sup>                             | -   | 5,03 | amarelo                  |
| 15                            | -   | 3,4 x 10 <sup>3</sup>                             | 4,90 | amarelo                  |
| 18                            | -   | 5,8 x 10 <sup>3</sup>                             | 5,0  | amarelo                  |
| 21                            | -   | 4,0 x 10 <sup>3</sup>                             | 5,0  | amarelo                  |
| 24                            | -   | 5,8 x 10 <sup>3</sup>                             | 5,0  | amarelo                  |

FONTE: O autor (2007)

TABELA 34 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS) E pH EM DIFERENTES TEMPOS NA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO 3 (PADRÃO E-CPPI)

| Tempo de incubação<br>(horas) | Bacilos viáveis<br>totais<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | Esporos viáveis<br>totais<br>UFC.mL <sup>-1</sup> | pH   | Coloração<br>dos frascos |
|-------------------------------|---|---|------|--------------------------|
| 0                             | -   | 7,6 x 10 <sup>4</sup>                             | 6,97 | violeta                  |
| 3                             | 6,4 x 10 <sup>6</sup>                             | -   | 6,92 | violeta                  |
| 6                             | 6,0 x 10 <sup>8</sup>                             | -   | 5,72 | Amarelo escuro           |
| 9                             | 6,0 x 10 <sup>7</sup>                             | -   | 5,16 | amarelo                  |
| 12                            | 6,5 x 10 <sup>4</sup>                             | -   | 4,91 | amarelo                  |
| 15                            | 1,6 x 10 <sup>4</sup>                             | -   | 4,86 | amarelo                  |
| 18                            | 8,9 x 10 <sup>4</sup>                             | -   | 4,90 | amarelo                  |
| 21                            | 2,6 x 10 <sup>4</sup>                             | -   | 5,02 | amarelo                  |
| 24                            | 4,6 x 10 <sup>4</sup>                             | -   | 4,82 | amarelo                  |

FONTE: O autor (2007)

Os meios 1 (VS 1:70-sem centrifugar) e 2 (VS 1:70-centrifugada) forneceram condições semelhantes para a germinação dos esporos, o que pode ser visualizado na FIGURA 34, (meio 1) e na FIGURA 35 (meio 2). Observou-se que a germinação dos esporos começou a ocorrer gradativamente desde o tempo zero, culminado na terceira hora de incubação. O máximo de multiplicação dos bacilos ocorreu na nona hora. A fase de declínio iniciou-se na décima segunda hora, juntamente com a formação de novos esporos. Na décima quinta hora, o processo estabilizou-se, com a esporulação dos bacilos sobreviventes. A alteração visível na coloração dos meios 1 e 2, de violeta para amarelo com turbidez, ocorreu com nove horas de incubação quando o pH atingiu 5,26 no meio 1 (VS a 1:70 - sem centrifugar) e 5,24 no meio 2 (VS a 1:70 - centrifugada).

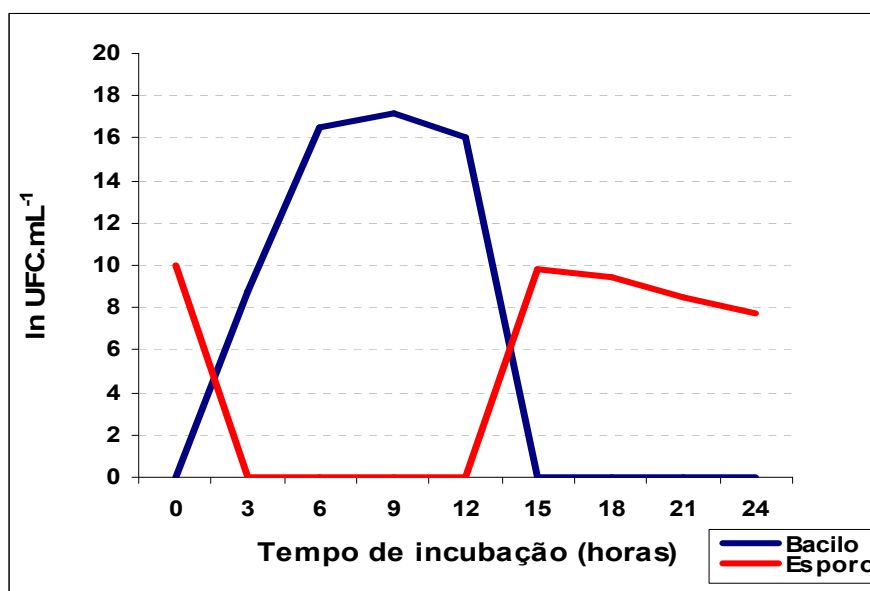


FIGURA 34 - CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO-1 (VS A 1:70 SEM CENTRIFUGAR)  
 FONTE: O autor (2007)

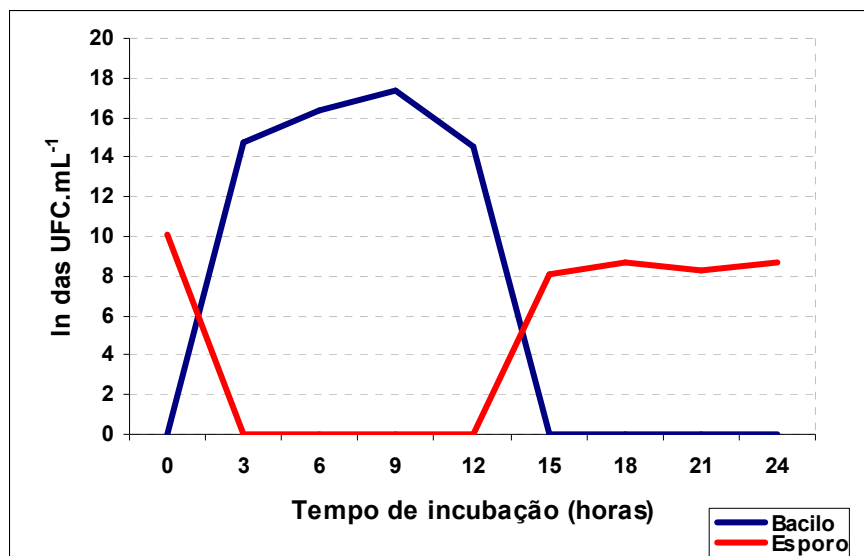


FIGURA 35 - CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO-2 (VS A 1:70 CENTRIFUGADA)

FONTE: O autor (2007)

O meio 3 (padrão E-CPPI) forneceu boas condições para a germinação dos esporos. A adaptação plena do microorganismo ocorreu com três horas de incubação, quando houve a germinação total dos esporos (FIGURA 36). Pequena diminuição na população de células viáveis foi verificada, porém não ocorreu morte total nas 24 horas de estudo. Este meio não propiciou condições para o bacilo voltar a esporular. O meio 3 começou a apresentar alteração na coloração com seis horas de incubação (pH 5,72), mas o tom do amarelo e o grau de turbidez considerados como positivo foram atingidos com nove horas, quando o pH atingiu 5,16.

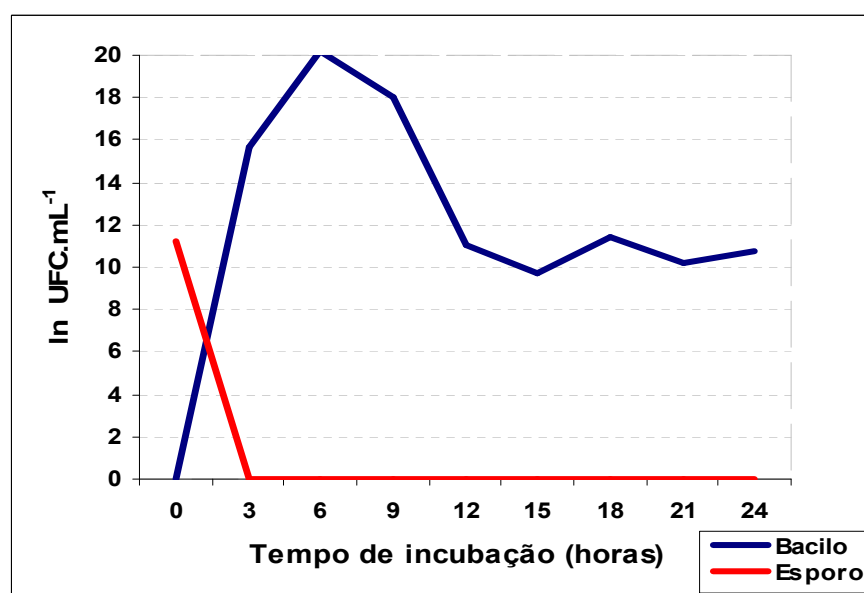


FIGURA 36 - CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO-3 (PADRÃO E-CPPI)

FONTE: O autor (2007)



## 5.8 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O MEIO DE CULTIVO DESENVOLVIDO COM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL E O MEIO CONTROLE E-CPPI

Os três meios estudados apresentaram viabilidade satisfatória com 24 horas de incubação.

Os valores médios obtidos para  $U_{SK}$  e  $D_{121^{\circ}C}$ , TS e TM para os meios VS (vinhaça de soja 1:70 sem extrato de leveduras), VS+EL (vinhaça de soja 1:70 com 0,8g% de extrato de leveduras) e meio padrão esteriteste CPPI, estão na TABELA 35, e o gráfico comparativo encontra-se na FIGURA 37.

TABELA35– VALORES DE  $U_{SK}$ ,  $D_{121^{\circ}C}$ , TS, TM e Z OBTIDOS PARA OS MEIOS VS+EL E PADRÃO ESTERITESTE-CPPI

| MEIO   | Valor de $D_{121^{\circ}C}$ (minutos) | Valor de $U_{SK}$ (minutos) | Valor de TS (minutos) | Valor de TM (minutos) |
|--|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Vinhaça de soja 1:70 sem extrato de leveduras (VS )    | $2,7 \pm 0,01$                        | $10,5 \pm 0,5$              | 4,2                   | 20,5                  |
| Vinhaça de soja 1:70 com extrato de leveduras (VS+EL ) | $2,9 \pm 0,14$                        | $11,0 \pm 0,7$              | 6,6                   | 24,2                  |
| Padrão Esteriteste-CPPI                                | $2,9 \pm 0,15$                        | $11,2 \pm 0,7$              | 6,5                   | 24,0                  |

FONTE: O autor (2008)

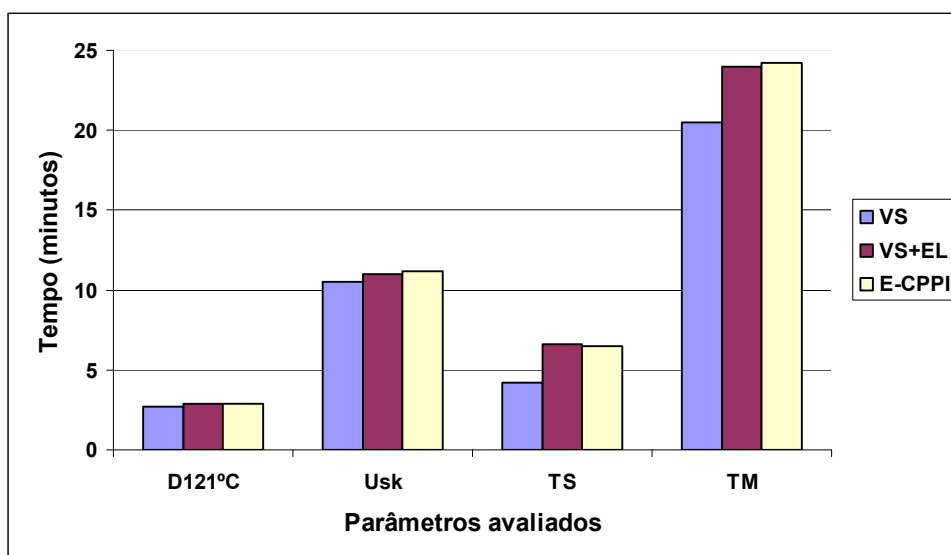


FIGURA 37 - VALORES DE  $U_{SK}$ ,  $D_{121^{\circ}C}$ , TS, TM e Z PARA OS MEIOS: VS 1:70; VS+EL E PADRÃO ESTERITESTE-CPPI (E-CPPI)

FONTE: O autor (2008)

Para danificar os esporos, aplicou-se um tempo subletal de autoclavação, de 8 minutos, que corresponde aproximadamente a 60 % do tempo médio de morte ( $U_{SK}$  – 13,4 minutos) do meio VS+EL.

O meio VS+EL teve os valores de  $U_{SK}$ ,  $D_{121^{\circ}C}$ , TS e TM aumentados em relação ao meio VS, sugerindo que a presença do extrato de leveduras favorece a germinação dos esporos sobreviventes. Os parâmetros estudados no meio VS+EL, ficaram muito próximos do meio padrão Esteriteste-CPPI.

Na determinação do valor de Z, (intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição, ou seja, determina quantos graus a temperatura de processamento deve aumentar para que o tempo de processamento possa sofrer uma redução decimal (STUMBO, 1973; TOLEDO, 1991; PENNA, 1997), foram encontrados os valores médios de 8,6 °C para o meio controle E-CPPI e de 10 °C para o meio VS+EL.

## 5.9 CINÉTICA DA GERMINAÇÃO E CONSUMO DE NUTRIENTES DE ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 DANIFICADOS PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO

### 5.9.1 Sem extrato de leveduras

Os resultados obtidos com a contagem de bacilos e esporos viáveis, pH e coloração dos frascos no meio VS (vinhaça de soja 1:70 sem extrato de leveduras) em diferentes tempos de cultivo estão demonstrados na TABELA 36.

TABELA 36 – CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACIOS E ESPOROS), pH E COLORAÇÃO DO MEIO POR TEMPO DE INCUBAÇÃO DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* NO MEIO VS

| Tempo (horas) | Esporos UFC.mL <sup>-1</sup> | Bacilos UFC.mL <sup>-1</sup> | pH   | Coloração dos frascos |
|---------------|------------------------------|------------------------------|------|-----------------------|
| 0             | 3,7x10 <sup>3</sup>          | 0                            | 6,60 | violeta               |
| 3             | 0                            | 2,4 x10 <sup>3</sup>         | 6,54 | violeta               |
| 6             | 0                            | 2,6 x10 <sup>3</sup>         | 6,37 | violeta               |
| 9             | 0                            | 1,7 x10 <sup>7</sup>         | 6,37 | violeta               |
| 12            | 0                            | 2,2 x10 <sup>7</sup>         | 5,90 | Amarelo escuro        |
| 15            | 0                            | 2,6 x10 <sup>7</sup>         | 5,68 | amarelo claro         |
| 18            | 6,0x10 <sup>2</sup>          | 2,0 x10 <sup>5</sup>         | 5,23 | Amarelo claro         |
| 21            | 4,0 x10 <sup>2</sup>         | 1,5 x10 <sup>4</sup>         | 5,13 | amarelo               |
| 24            | 4,6 x10 <sup>2</sup>         | 2,0x10 <sup>3</sup>          | 5,25 | amarelo               |

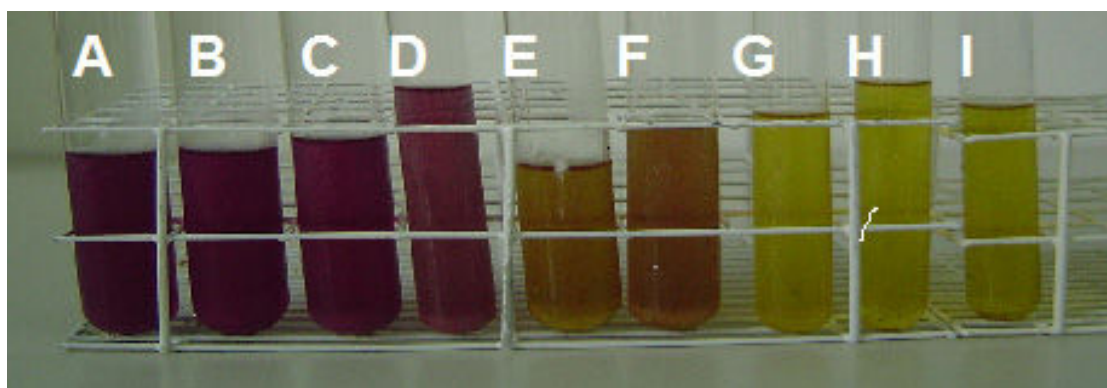
FONTE: O autor (2008)

Conforme os esporos vão germinando, passando para bacilos e estes vão se multiplicando, vai ocorrendo alteração da coloração do meio devido a alterações do pH. A curva de crescimento do *Geobacillus stearothermophilus*, no meio VS pode

ser observada na FIGURA 38 (A: observação visual da germinação dos esporos; B: gráfico das contagens de células-esporos e bacilos).

A partir de 12 horas de incubação (tubo E), o meio começou a amarelar, atingindo o tom ideal com 18 horas (tubo G), quando o pH ficou abaixo de 5,5. Na FIGURA 38B pode-se visualizar que os esporos suspensos no meio VS, tiveram a germinação total a partir da terceira hora de incubação. Devido aos intervalos de avaliação, não ficou claro o período de adaptação do microorganismo ou fase lag, mas ocorreu dentro das três primeiras horas. O ápice da fase logarítmica ocorreu às nove horas, seguida de um período estacionário de aproximadamente 6 horas, com posterior início da fase de declínio às quinze horas de incubação. O meio com vinhaça de soja propiciou ao bacilo condições para que voltasse a esporular, fato observado na Figura 38B, com quinze horas de incubação.

**A**



**B**

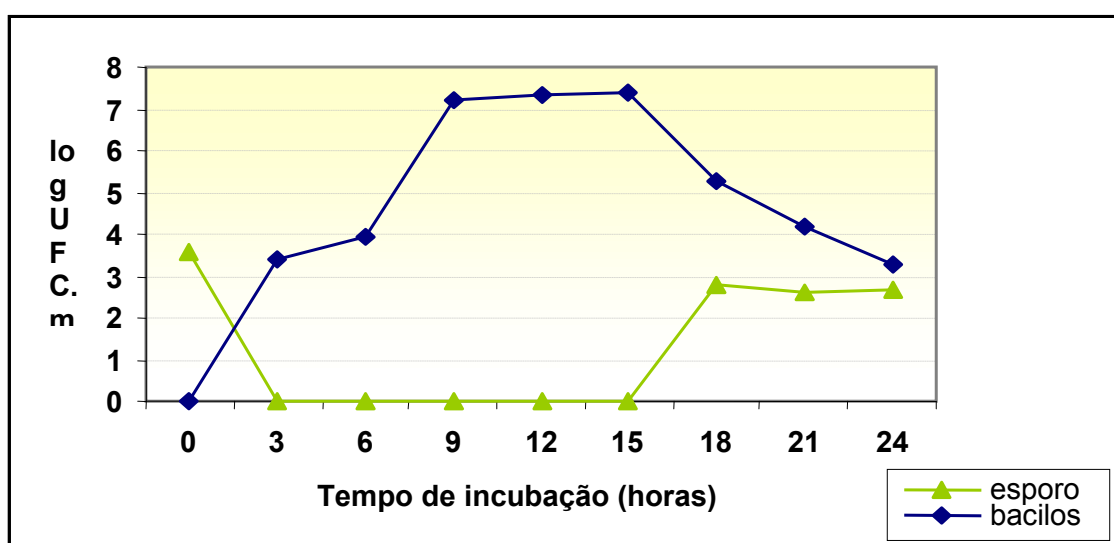


FIGURA 38 – **A)** CURVA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO VS: (A) 0 HORA; (B) 3 HORAS; (C) 6 HORAS; (D) 9 HORAS; (E) 12 HORAS; (F) 15 HORAS; (G) 18 HORAS; (H) 21 HORAS; (I) 24 HORAS;

**B) CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO NO MEIO VS**

FONTE: O autor (2008)

**5.9.2 Com extrato de leveduras**

Os resultados referentes à quantificação de bacilos e esporos viáveis, determinação do pH e observação da coloração do meio VS+EL (vinhaça de soja 1:70 com extrato de leveduras) encontram-se na TABELA 37.

TABELA 37 - CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS), pH E COLORAÇÃO DO MEIO POR TEMPO DE INCUBAÇÃO DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* NO MEIO VS+EL

| <b>Tempo (horas)</b> | <b>Esporos UFC.mL<sup>-1</sup></b> | <b>Bacilos UFC.mL<sup>-1</sup></b> | <b>pH</b> | <b>Coloração dos frascos</b> |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------|------------------------------|
| 0                    | 1,9x10 <sup>4</sup>                | 0                                  | 7,13      | violeta                      |
| 3                    | 5,4 x10 <sup>2</sup>               | 4,0 x10 <sup>2</sup>               | 6,78      | violeta                      |
| 6                    | 1,2 x10 <sup>2</sup>               | 2,4 x10 <sup>4</sup>               | 6,80      | violeta                      |
| 9                    | 0                                  | 4,7 x10 <sup>6</sup>               | 6,38      | violeta                      |
| 12                   | 5,8 x10 <sup>2</sup>               | 1,8 x10 <sup>6</sup>               | 5,49      | amarelo                      |
| 15                   | 1,0 x10 <sup>2</sup>               | 3,7 x10 <sup>6</sup>               | 5,24      | amarelo                      |
| 18                   | 1,1 x10 <sup>2</sup>               | 2,7 x10 <sup>6</sup>               | 5,11      | amarelo                      |
| 21                   | 8,3 x10 <sup>2</sup>               | 2,2 x10 <sup>5</sup>               | 5,15      | amarelo                      |
| 24                   | 5,4 x10 <sup>2</sup>               | 1,9 x10 <sup>5</sup>               | 5,11      | amarelo                      |

FONTE: O Autor (2008)

Na cinética da germinação dos esporos no meio VS+EL onde observou-se a mudança de coloração conforme o desenvolvimento dos bacilos (FIGURA 39 A). Verificou-se que a partir da nona hora (tubo D) o meio começou a apresentar mudança na coloração, atingindo o tom de amarelo desejado com 12 horas de incubação (tubo E) e pH 5,49. A curva da cinética de germinação dos esporos no meio VS+EL está demonstrada na FIGURA 39 B .

A germinação dos esporos iniciou-se logo após a incubação, ocorrendo na totalidade com nove horas. O meio propiciou condições para que os bacilos voltassem a esporular, o que ocorreu logo após a nona hora. A população de bacilos manteve-se estável até a vigésima primeira hora. A partir de então, a curva demonstrou que as populações de esporos e bacilos tenderam a diminuir.

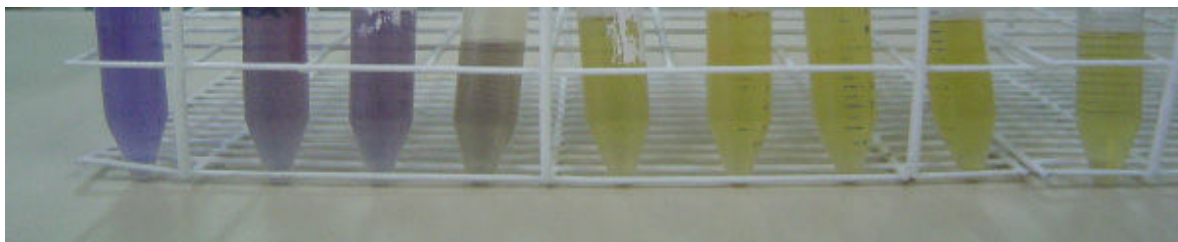
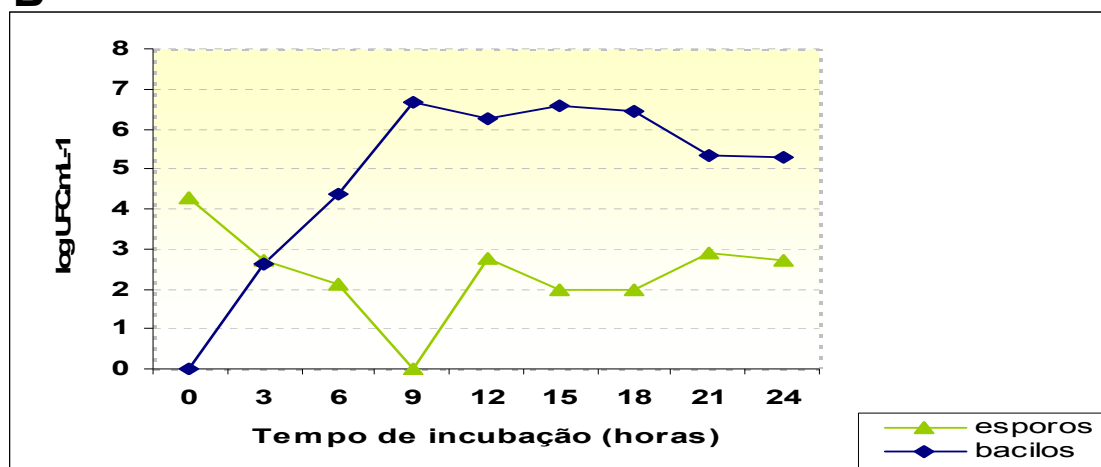
**A****B**

FIGURA 39 – **A)** CINÉTICA DA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO VS+EL: (A) 0 HORA; (B) 3 HORAS; (C) 6 HORAS; (D) 9 HORAS; (E) 12 HORAS; (F) 15 HORAS; (G) 18 HORAS; (H) 21 HORAS; (I) 24 HORAS; **B)** CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO NO MEIO VS+EL

FONTE: O autor (2008)

### 5.9.3 Meio controle E-CPPI

Os resultados sobre a quantificação de bacilos e esporos viáveis, determinação do pH e observação da alteração na coloração do meio controle E-CPPI estão contidos na TABELA 38. Neste meio percebe-se a mudança na coloração de violeta para amarelo na nona hora de incubação e pH 5,32.

TABELA 38 – CÉLULAS VIÁVEIS TOTAIS (BACILOS E ESPOROS), pH E COLORAÇÃO DO MEIO POR TEMPO DE INCUBAÇÃO DOS ESPOROS DE *Geobacillus stearothermophilus* NO MEIO VS+EL

| <b>Tempo (horas)</b> | <b>Esporos UFC.mL<sup>-1</sup></b> | <b>Bacilos UFC.mL<sup>-1</sup></b> | <b>pH</b> | <b>Coloração dos frascos</b> |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------|------------------------------|
| 0                    | 1,7x10 <sup>4</sup>                | 0                                  | 6,78      | violeta                      |
| 3                    | 0                                  | 2,2 x10 <sup>4</sup>               | 6,77      | violeta                      |
| 6                    | 0                                  | 1,6 x10 <sup>5</sup>               | 6,07      | violeta                      |
| 9                    | 0                                  | 5,5 x10 <sup>7</sup>               | 5,32      | amarelo                      |
| 12                   | 0                                  | 3,2 x10 <sup>8</sup>               | 4,96      | amarelo                      |
| 15                   | 0                                  | 2,2 x10 <sup>7</sup>               | 4,92      | amarelo                      |
| 18                   | 0                                  | 2,2 x10 <sup>6</sup>               | 4,91      | amarelo                      |
| 21                   | 0                                  | 1,3 x10 <sup>6</sup>               | 4,92      | amarelo                      |
| 24                   | 0                                  | 6,0 x10 <sup>2</sup>               | 4,93      | amarelo                      |

FONTE: O autor (2008)

A visualização da alteração do pH decorrente da multiplicação do bacilo e conseqüente liberação de metabólitos ácidos, ocorreu através da mudança na coloração do meio de cultura de violeta para amarelo, viabilizada pela presença do púrpura de bromocresol. A partir de nove horas de incubação, verificou-se a total mudança de coloração, como pode ser observada na FIGURA 40 A.

A curva de germinação dos esporos no meio controle E-CPPI obtida está demonstrada na FIGURA 40 B. Neste experimento também foi difícil determinar a fase lag, provavelmente pelos intervalos entre as coletas de amostras. O máximo crescimento ocorreu após doze horas de incubação, entrando em fase de declínio a partir de então. Não foi observada nova esporulação.

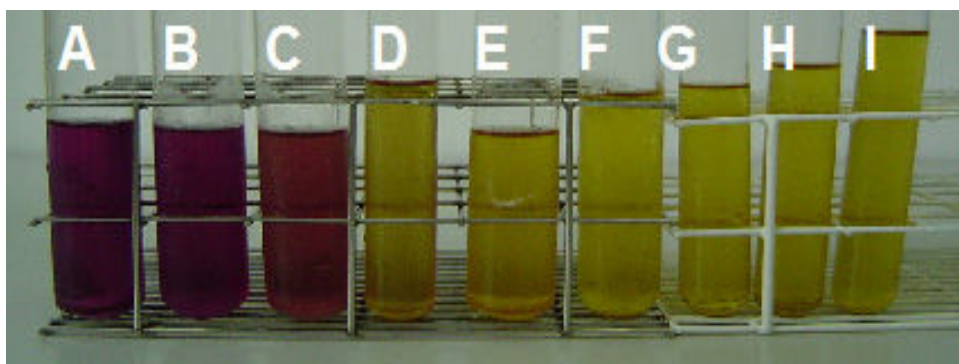
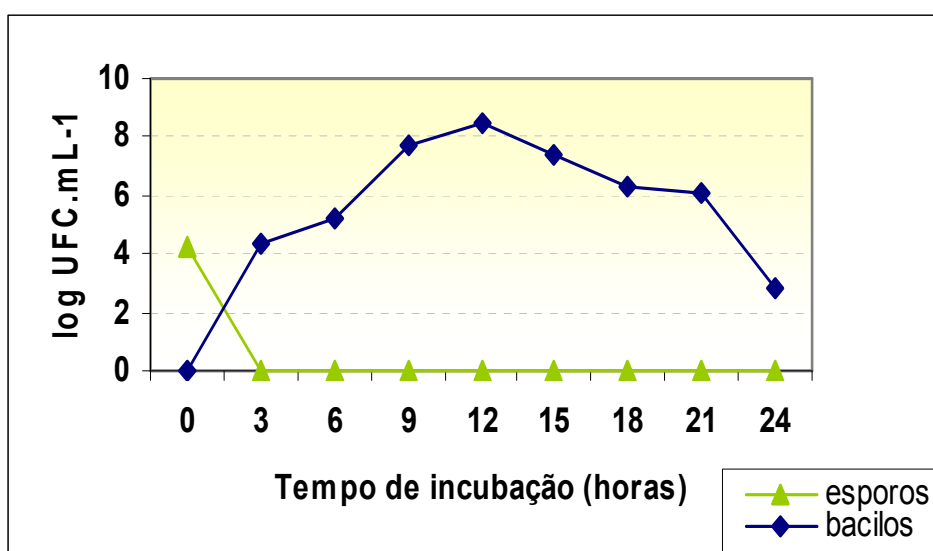
**A****B**

FIGURA 40 – **A)** GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NO MEIO CONTROLE E-CPPI: (A) 0 HORA; (B) 3 HORAS; (C) 6 HORAS; (D) 9 HORAS; (E) 12 HORAS; (F) 15 HORAS; (G) 18 HORAS; (H) 21 HORAS; (I) 24 HORAS;  
**B)** FIGURA 41 - CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR NO MEIO CONTROLE E-CPPI

FONTE: O autor (2008)

O meio padrão não forneceu condições para os bacilos esporularem, apesar do pH ácido e redução dos nutrientes decorrente da multiplicação do bacilo.

O gráfico que compara a germinação e posterior formação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 durante a cinética realizada com os meios VS 1:70, VS 1:70+EL e controle E-CPPI está disposta na FIGURA 41.

Nas primeiras três horas de incubação houve a germinação completa dos esporos em todos os meios (observada pela diminuição da população de esporos).

O meio padrão Esteriteste-CPPI não forneceu condições para ocorrer nova esporulação com os bacilos germinados.

Os meios com vinhaça de soja 1:70, com e sem extrato de leveduras, comportaram-se de maneira semelhante, propiciando condições para que os bacilos formados voltassem a esporular.

O meio VS+EL estimulou a esporulação quase que imediatamente após a germinação total dos esporos, enquanto que no meio VS, a esporulação ocorreu novamente em torno da décima quinta hora.

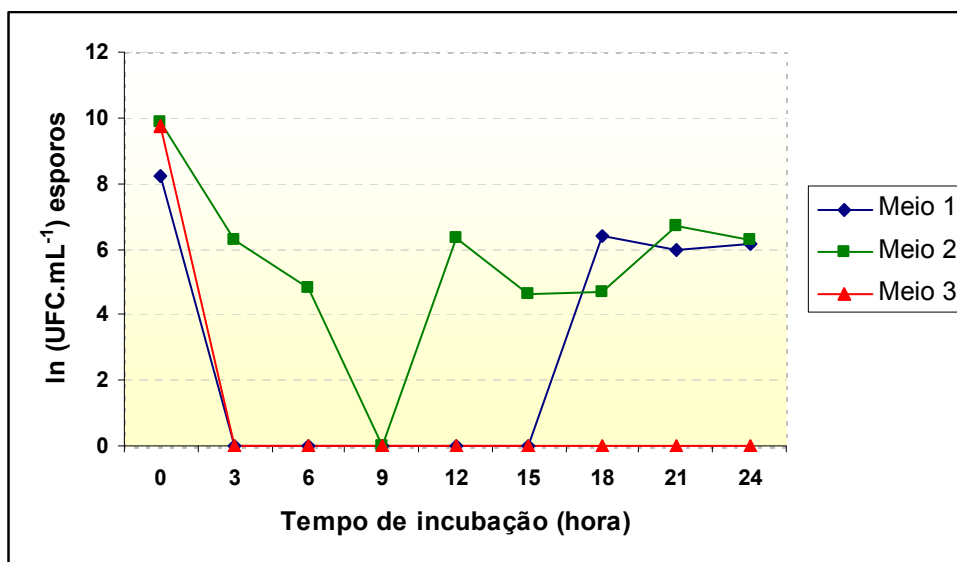


FIGURA 41 - GERMINAÇÃO DOS ESPOROS PRESENTES NOS MEIOS: 1- VS; 2 – VS+EL E MEIO 3 - E-CPPI (CONTROLE)

FONTE: O Autor (2008)

A quantificação dos carboidratos (estaquiose, rafinose e galactose+frutose) por meio de HPLC e proteínas pelo método Lowry no meio VS+EL por tempo de incubação tem seus resultados demonstrados na TABELA 39.

TABELA 39 – CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS NA CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR NO MEIO VS+EL

| Tempo (horas) | Esporos (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | Bacilos (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | Estaquiose (mg.mL <sup>-1</sup> ) | Rafinose (mg.mL <sup>-1</sup> ) | Gal+fru (mg.mL <sup>-1</sup> ) | Proteínas (mg.mL <sup>-1</sup> ) |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 0             | 3,2x10 <sup>2</sup>             | 0                               | 1,10                              | 1,70                            | 0,6                            | 2,0                              |
| 3             | 3,2x10 <sup>2</sup>             | 0                               | 0,98                              | 1,50                            | 0                              | 2,2                              |
| 6             | 0                               | 1,0 x10 <sup>4</sup>            | 0,90                              | 1,20                            | 0                              | 1,9                              |
| 9             | 3,4 x10 <sup>3</sup>            | 2,5 x10 <sup>7</sup>            | 0,98                              | 1,42                            | 0                              | 2,2                              |
| 12            | 1,1 x10 <sup>3</sup>            | 4,2 x10 <sup>6</sup>            | 0,93                              | 1,31                            | 0                              | 2,3                              |
| 18            | 1,7 x10 <sup>4</sup>            | 4,5 x10 <sup>6</sup>            | 0,93                              | 1,10                            | 0                              | 2,2                              |
| 24            | 0                               | 4,9 x10 <sup>4</sup>            | 0,93                              | 1,10                            | 0                              | 2,2                              |

FONTE: O autor (2008)



O consumo dos carboidratos na cinética de germinação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 no meio VS+EL está demonstrado graficamente na FIGURA 42.

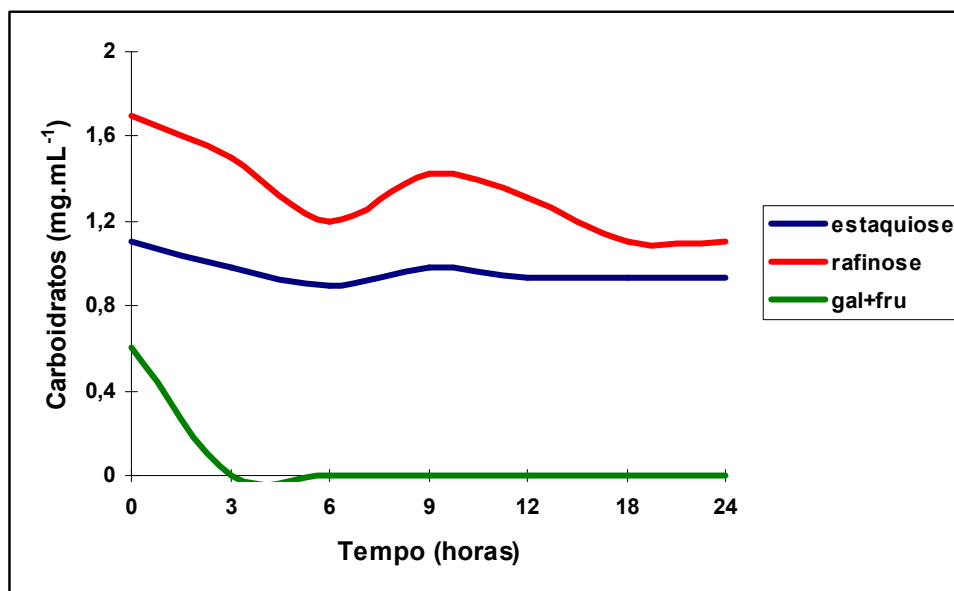


FIGURA 42 –CONSUMO DE CARBOIDRATOS PELO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 NA CINÉTICA DE GERMINAÇÃO – MEIO VS+EL  
FONTE: O autor (2008)

Houve um consumo de 100% da galactose + frutose nas primeiras 3 horas de incubação, coincidindo com o período onde ocorreu boa parte da germinação dos esporos (FIGURA 43). Durante o período estudado (24 horas) houve um consumo de 0,12 mg.mL<sup>-1</sup> de estaquiase, correspondendo a 10,9% do total presente no meio. O consumo de rafinose no mesmo período foi de 35,29% equivalente a 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>.

Foram consumidos 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteínas, equivalente a 5%, nas seis primeiras horas quando ocorreu a germinação total dos esporos. Após, houve um leve aumento de 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> até a décima segunda hora, ocorrendo posterior estabilização.

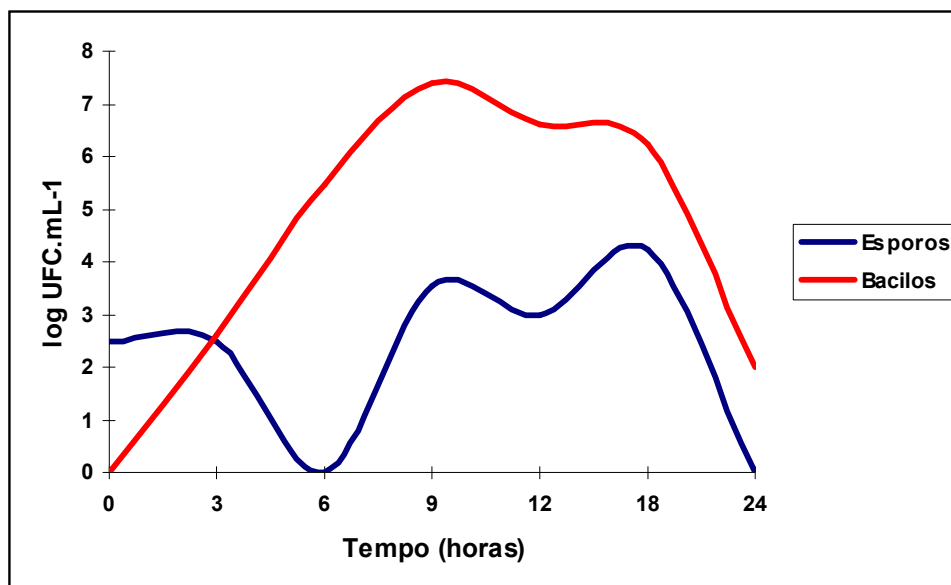


FIGURA 43 – GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 no meio VS+EL

FONTE: O autor (2008)

A TABELA 40 contém as concentrações de glicose e proteínas no meio padrão Esteriteste-CPPI durante a cinética de germinação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus*.

TABELA 40 – CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR NO MEIO CONTROLE E-CPPI

| Tempo (horas) | Esporos (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | Bacilos (UFC.mL <sup>-1</sup> ) | Glicose (mg.mL <sup>-1</sup> ) | Proteínas (mg.mL <sup>-1</sup> ) |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 0             | 1,7x10 <sup>4</sup>             | 0                               | 2,1                            | 2,6                              |
| 3             | 0                               | 2,2 x10 <sup>4</sup>            | 2,7                            | 7,1                              |
| 6             | 0                               | 1,6 x10 <sup>5</sup>            | 1,9                            | 7,5                              |
| 12            | 0                               | 3,2 x10 <sup>8</sup>            | 1,2                            | 7,4                              |
| 15            | 0                               | 2,2 x10 <sup>4</sup>            | 1,0                            | 7,2                              |
| 18            | 0                               | 2,2 x10 <sup>6</sup>            | 0,95                           | 7,1                              |
| 24            | 0                               | 6,0 x10 <sup>2</sup>            | 1,65                           | 6,8                              |

FONTE: O AUTOR (2008)

A FIGURA 44 demonstra as concentrações de glicose e proteína, bem como a cinética de germinação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953.

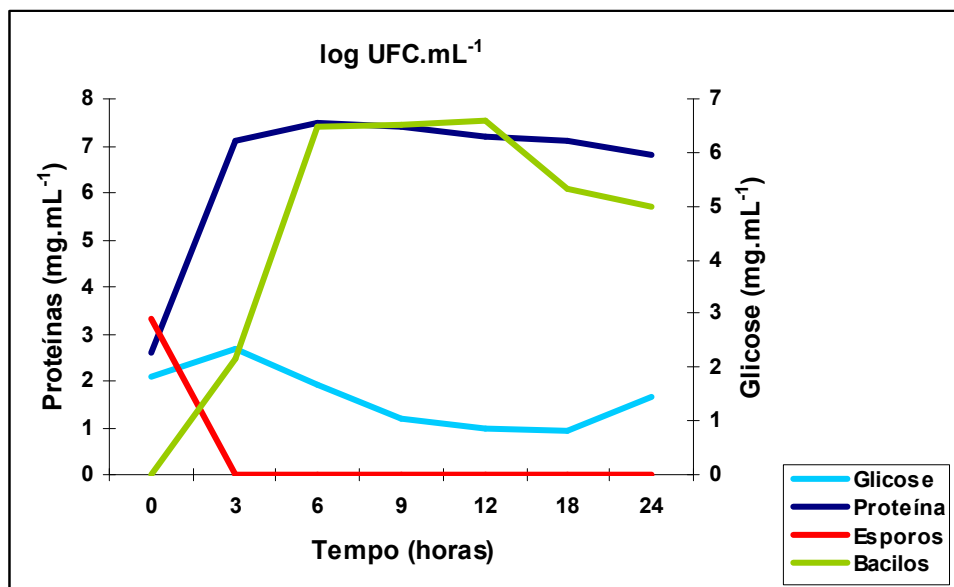


FIGURA 44 - CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR E CONSUMO DE GLICOSE E PROTEÍNAS NO MEIO CONTROLE E-CPPI  
 FONTE: O autor (2008)

O consumo de glicose em 24 horas foi de 0,45 mg.mL<sup>-1</sup>. Houve um aumento na concentração nas três primeiras horas de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>.

A concentração de proteínas teve um aumento de 4,5 mg.mL<sup>-1</sup> nas primeiras três horas seguida de um consumo de 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> ao final do período.

#### 5.10 VALIDAÇÃO DA EFICÁCIA DOS MEIOS DE CULTURA COM RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA (VINHAÇA DE SOJA) EM GERMINAR ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953

##### 5.10.1 Viabilidade

Todos os meios estudados, com e sem extrato de leveduras que foram submetidos ao teste, apresentaram viabilidade satisfatória, ou seja, 100% dos frascos tiveram crescimento microbiano, mudando a coloração para amarelo até 24 horas de incubação (TABELA 41).

TABELA 41 – VIABILIDADE DOS ESPOROS SUSPENSOS EM MEIOS COM E SEM EXTRATO DE LEVEDURAS

| MEIO | Lote da suspensão de esporos | Resultado em 24 horas (frascos) |
|------|------------------------------|---------------------------------|
| 1 A  | 02/06                        | 10+                             |
| 1 A  | 01/07                        | 10+                             |
| 1 A  | 02/07                        | 10+                             |
| 2 A  | 02/06                        | 10+                             |
| 2 A  | 01/07                        | 10+                             |
| 2 A  | 02/07                        | 10+                             |
| 3 A  | 02/06                        | 10+                             |
| 3 A  | 01/07                        | 10+                             |
| 3 A  | 02/07                        | 10+                             |
| 4 A  | 02/06                        | 10+                             |
| 4 A  | 01/07                        | 10+                             |
| 4 A  | 02/07                        | 10+                             |
| 1 B  | 02/06                        | 10+                             |
| 1 B  | 01/07                        | 10+                             |
| 1 B  | 02/07                        | 10+                             |
| 2 B  | 02/06                        | 10+                             |
| 2 B  | 01/07                        | 10+                             |
| 2 B  | 02/07                        | 10+                             |
| 3 B  | 02/06                        | 10+                             |
| 3 B  | 01/07                        | 10+                             |
| 3 B  | 02/07                        | 10+                             |
| 4 B  | 02/06                        | 10+                             |
| 4 B  | 01/07                        | 10+                             |
| 4 B  | 02/07                        | 10+                             |

FONTE: O AUTOR (2008)

NOTA: A – sem extrato de leveduras; B – com extrato de leveduras

As FIGURAS 45 e 46 contêm grupos de frascos antes e após a incubação, ilustrando a mudança na coloração dos meios com viabilidade satisfatória.



FIGURA 45 – FRASCOS ANTES DA INCUBAÇÃO

FONTE – O autor (2008)

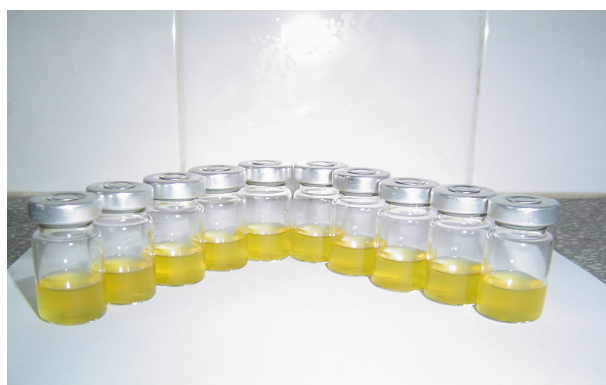


FIGURA 46 – FRASCOS APÓS 24 h DE INCUBAÇÃO

FONTE – O autor (2008)

## 5.10.2 Resistência térmica no tempo de sobrevivência (TS) e tempo médio de Morte (TM)

### 5.10.2.1 Meios preparados sem extrato de leveduras

No teste de Tempo de sobrevivência (TS), o meio 2A inoculado com a suspensão de esporos lote 02/07 apresentou resultado satisfatório no quinto dia de incubação, o meio 3A-02/07 no sexto dia e os meios 2A-01/07, 3A-02/06 e 3A-01/07 no sétimo dia. Os demais meios, 1A-02/06, 1A-01/07, 1A-02/07, 2A-02/06, 4A-02/06, 4A-01/07 e 4A-02/07, também apresentaram resultados satisfatórios no primeiro dia de incubação.

Ao final do sétimo dia de incubação, todos os meios apresentaram resultados satisfatórios, promovendo crescimento em 100% das amostras, conforme resultados demonstrados na TABELA 42.

TABELA 42 - CAPACIDADE DO MEIO **SEM** EXTRATO DE LEVEDURAS EM GERMINAR OS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A 5 MINUTOS DE AUTOCLAVAÇÃO A 121°C/1ATM

| MEIO- Lote da suspensão de esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 A-02/06                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 A-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 A-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 A-02/06                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 A-01/07                          | 3+7-  | 3+7-   | 4+6-   | 4+6-   | 4+6-   | 9+1-   | 10+    |
| 2 A-02/07                          | 8+2-  | 9+1-   | 9+1-   | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 6+4-   | 6+4-   | 6+4-   | 8+2-   | 10+    |
| 3 A-01/07                          | 2+8-  | 2+8-   | 2+8-   | 2+8-   | 2+8-   | 6+4-   | 10+    |
| 3 A-02/07                          | 9+1-  | 9+1-   | 9+1-   | 9+1-   | 9+1-   | 10+    | 10+    |
| 4 A-02/06                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 A-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 A-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |

FONTE: O AUTOR (2008)

Como demonstrado na FIGURA 47 na determinação do tempo de sobrevivência (TS) do meio 3A-01/07 verificou-se que no sexto dia de incubação, apresentou quatro frascos negativos e seis positivos. No sétimo dia, houve 100% de crescimento, ou seja, todos os frascos ficaram amarelos com turbidez.



FIGURA 47 – RESULTADO DO SEXTO DIA DE INCUBAÇÃO DO TESTE DE AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (TS) PARA O MEIO 3A-01/07

FONTE: O autor (2008)

Nenhum dos frascos apresentou germinação dos esporos na verificação da capacidade do meio em germinar esporos no tempo médio de morte (TM) de quinze minutos. Este resultado é considerado satisfatório. Os resultados encontram-se na TABELA 43.

TABELA 43 - CAPACIDADE DO MEIO **SEM** EXTRATO DE LEVEDURAS EM GERMINAR OS ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A **15 MINUTOS** DE AUTOCLAVAÇÃO A 121°C/1ATM

| MEIO- Lote da suspensão de esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 1 A-01/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 1 A-02/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 2 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 2 A-01/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 2 A-02/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 3 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 3 A-01/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 3 A-02/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 4 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 4 A-01/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 4 A-02/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |

FONTE: O AUTOR (2008)

#### 5.10.2.2 Meios preparados com extrato de leveduras

Os meios 3B-01/07 e 4B-02/06 apresentaram todos os frascos positivos no quarto dia de incubação. O meio 1B-01/07 obteve o mesmo resultado no segundo

dia e os demais no primeiro dia. Portanto todos os meios apresentaram resultado satisfatório para o Tempo de sobrevivência (TS). Resultados na TABELA 44.

TABELA 44 - CAPACIDADE DO MEIO **COM** EXTRATO DE LEVEDURAS EM GERMINAR ESPOROS DANIFICADOS PELO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A **5 MINUTOS** DE AUTOCLAVAÇÃO

| MEIO- Lote da suspensão de esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 B-02/06                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 B-01/07                          | 5+5-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-02/06                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-02/06                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-01/07                          | 8+2-  | 9+1-   | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-02/06                          | 9+1-  | 9+1-   | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |

FONTE: O AUTOR (2008)

Os meios 3B-01/07 e 4B-02/06, apresentaram resultados satisfatórios em 4 dias, o lote 1B-01/07 no segundo dia e os demais com 24 horas de incubação recuperaram os esporos propiciando a mudança na coloração do meio. Na avaliação do tempo de sobrevivência (5 minutos), observou-se que todos os meios tiveram a capacidade de germinação preservada.

Os frascos do lote 4B-02/06 no terceiro dia de incubação, onde se percebe a presença de apenas um frasco negativo (violeta) enquanto os outros nove estão positivos (amarelos) estão demonstrados na FIGURA 48.

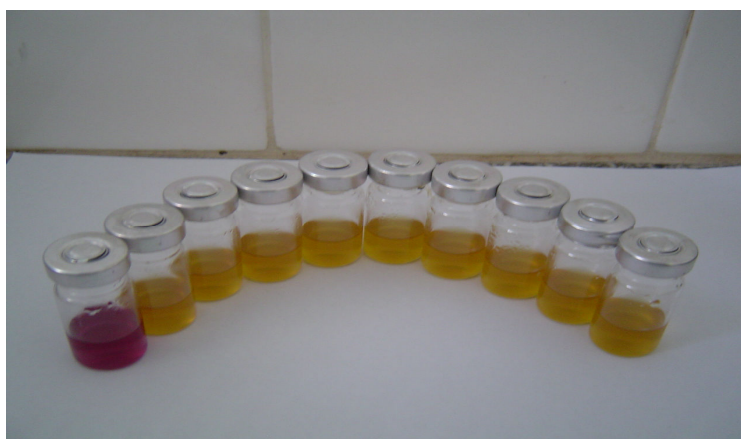


FIGURA 48 – TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (TS) DO LOTE 4B-02/06

FONTE – O AUTOR (2008)

Os dados compilados das análises realizadas com os meios com extrato de leveduras no tempo médio de morte (TM). Os resultados foram satisfatórios, pois nenhum lote apresentou resultados positivos demonstrados na TABELA 45.

TABELA 45 - ANÁLISE DA CAPACIDADE DO MEIO **COM** EXTRATO DE LEVEDURAS EM GERMINAR OS ESPOROS DANIFICADOS PELA AÇÃO DO CALOR APÓS EXPOSIÇÃO A **15 MINUTOS** DE AUTOCLAVAÇÃO

| MEIO- Lote da<br>suspensão de esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|---------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 B-02/06                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 1 B-01/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 1 B-02/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 2 B-02/06                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 2 B-01/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 2 B-02/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 3 B-02/06                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 3 B-01/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 3 B-02/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 4 B-02/06                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 4 B-01/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |
| 4 B-02/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    |

FONTE: O AUTOR (2008)

### 5.10.2.3 Pesquisa de contaminantes

Foram obtidos resultados satisfatórios para todos os lotes de meio estudados, com e sem extrato de leveduras. Os frascos permaneceram com a coloração inicial violeta límpido ao final dos sete dias de incubação, demonstrando ausência de contaminantes.

### 5.10.2.4 Verificação da capacidade do meio em germinar após ser submetido a esterilização adicional de 15 minutos

Os resultados foram baseados nos critérios de positivo (+) para frascos com alteração da cor para amarelo e negativo (-) para frascos sem alteração da coloração, permanecendo violeta.

Os resultados referentes aos lotes sem extrato de leveduras e inoculados com 100 UFC.3mL<sup>-1</sup> estão descritos na TABELA 46.



TABELA 46 – VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA  
SEM EXTRATO DE LEVEDURAS GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE  
100 UFC.3mL<sup>-1</sup>

| MEIO- Lote da<br>suspensão de<br>esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|--|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 A-02/06                                | 10-   | 10-    | 10-    | 7+3-   | 9+1-   | 10+    | 10+    |
| 1 A-01/07                                | 10-   | 7+3-   | 8+2-   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 A-02/07                                | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 A-02/06                                | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 8+2-   | 8+2-   | 10+    |
| 2 A-01/07                                | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10+    | 10+    |
| 2 A-02/07                                | 10-   | 3+7-   | 8+2-   | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 A-02/06                                | 10-   | 10-    | 7+3-   | 8+2-   | 8+2-   | 9+1-   | 10+    |
| 3 A-01/07                                | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 A-02/07                                | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 A-02/06                                | 10-   | 10-    | 5+5-   | 7+3-   | 8+2-   | 10+    | 10+    |
| 4 A-01/07                                | 9+1-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 A-02/07                                | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10+    | 10+    | 10+    |

FONTE- O AUTOR (2008)

A TABELA 47 apresenta os dados referentes aos meios com extrato de leveduras e inoculados com 1000 UFC.3mL<sup>-1</sup>.

TABELA 47 – VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA  
COM EXTRATO DE LEVEDURAS GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE  
100 UFC.3mL<sup>-1</sup>

| MEIO- Lote da<br>suspensão de esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|---------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 B-02/06                             | 10-   | 10-    | 10-    | 6+4-   | 9+1-   | 10+    | 10+    |
| 1 B-01/07                             | 9+1-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 B-02/07                             | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-02/06                             | 8+2-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-01/07                             | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-02/07                             | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10+    | 10+    |
| 3 B-02/06                             | 6+4-  | 8+2-   | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-01/07                             | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-02/07                             | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-02/06                             | 9+1-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-01/07                             | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-02/07                             | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |

FONTE- O AUTOR (2008)

Os resultados dos frascos do lote 2b 02/06 com 24 horas de incubação, onde verifica-se que dos dez frascos incubados, oito já apresentavam-se positivos com alteração na coloração, enquanto dois ainda permaneciam violeta, portanto, negativos, estão demonstrados na FIGURA 49.

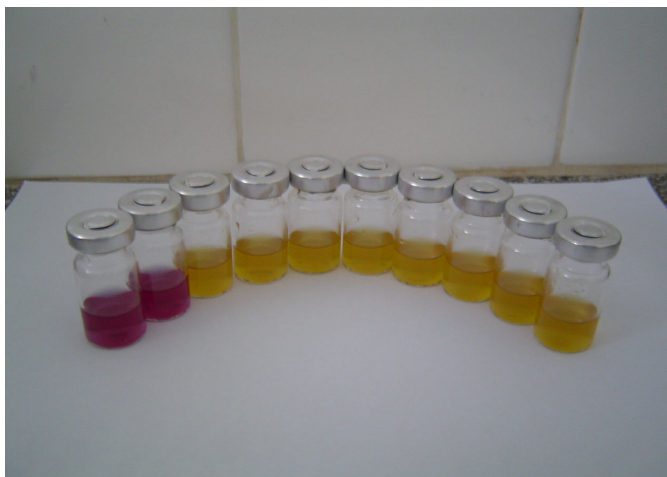


FIGURA 49 –GERMINAÇÃO DOS ESPOROS NO MEIO 2B 02/06 COM INÓCULO DE 100 UFC.3ML APÓS 24HORAS DE INCUBAÇÃO

Os resultados dos meios sem extrato de leveduras inoculados com 1000 UFC.3mL<sup>-1</sup> estão descritos na TABELA 48.

TABELA 48 – VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA SEM EXTRATO DE LEVEDURAS GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE 1000 UFC.3mL<sup>-1</sup>

| MEIO- Lote da suspensão de esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 10-    | 7+3-   | 9+1-   | 10+    | 10+    |
| 1 A-01/07                          | 10-   | 7+3-   | 8+2-   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 A-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 8+2-   | 8+2-   | 10+    |
| 2 A-01/07                          | 10-   | 10-    | 10-    | 10-    | 10-    | 10+    | 10+    |
| 2 A-02/07                          | 10-   | 6+4-   | 10+    | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 7+3-   | 8+2-   | 8+2-   | 9+1-   | 10+    |
| 3 A-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 A-02/07                          | 9+1-  | 9+1-   | 9+1-   | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 A-02/06                          | 10-   | 10-    | 5+5-   | 7+3-   | 8+2-   | 10+    | 10+    |
| 4 A-01/07                          | 9+1-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 A-02/07                          | 10-   | 4+6-   | 4+6-   | 6+4-   | 10+    | 10+    | 10+    |

FONTE- O AUTOR (2008)

Os resultados referentes aos meios com extrato de leveduras e inoculados com 1000 UFC.3mL<sup>-1</sup> encontram-se na TABELA 49.

TABELA 49 – VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DO MEIO COMPOSTO POR VINHAÇA DE SOJA COM EXTRATO DE LEVEDURAS EM GERMINAR OS ESPOROS COM UM INÓCULO DE 1000 UFC.3mL<sup>-1</sup>

| MEIO- Lote da suspensão de esporos | 1 dia | 2 dias | 3 dias | 4 dias | 5 dias | 6 dias | 7 dias |
|------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 B-02/06                          | 10-   | 10-    | 10-    | 6+4-   | 9+1-   | 10+    | 10+    |
| 1 B-01/07                          | 9+1-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 1 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-02/06                          | 9+1-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 2 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-02/06                          | 7+3-  | 9+1-   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 3 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-02/06                          | 9+1-  | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-01/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |
| 4 B-02/07                          | 10+   | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    | 10+    |

FONTE- O AUTOR (2008)

## 5.11 ESTUDO DA ESTABILIDADE

Os resultados das análises de viabilidade, valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{\text{SK}}$ , tempo de sobrevivência (TS) e tempo de morte (TM), para o meio VS 1:70+EL, encontram-se na TABELA 50. Foi satisfatório o resultado para viabilidade, houve crescimento microbiano no meio, provocando alteração na coloração em 100% das amostras analisadas.

TABELA 50: ESTUDO DE ESTABILIDADE DO MEIO VS 1:70+EL

| Tempo (meses) | Viabilidade  | $D_{121^{\circ}\text{C}}$ (minutos) | $U_{\text{SK}}$ (minutos) | TS (minutos) | TM (minutos) |
|---------------|--------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|
| Zero          | satisfatória | $2,8 \pm 0,12$                      | $13,6 \pm 0,6$            | 7,6          | 24,4         |
| Três          | satisfatória | $2,5 \pm 0,13$                      | $12,1 \pm 0,7$            | 6,9          | 22,2         |
| Seis          | satisfatória | $2,4 \pm 0,10$                      | $11,4 \pm 0,5$            | 6,5          | 20,9         |
| Nove          | satisfatória | $2,3 \pm 0,14$                      | $11,2 \pm 0,7$            | 6,1          | 19,7         |
| Doze          | satisfatória | $2,1 \pm 0,22$                      | $10,8 \pm 0,8$            | 5,6          | 18,2         |

FONTE: O Autor (2008)

## 5.12 CUSTOS DE PRODUÇÃO

O levantamento dos custos de produção dos IB produzidos com o meio E-CPPI e com matéria-prima proveniente de resíduos da agroindústria (vinhaça de soja), foram realizados levando-se em conta apenas os custos diretos com matéria-

prima e controle de qualidade. Não foram avaliados os custos indiretos como a mão de obra, embalagens, energia e custos administrativos.

Os custos com a produção dos meios para germinação dos esporos (controle E-CPPI e VS+EL) encontram-se na TABELA 51.

TABELA 51 - FORMULAÇÃO E CUSTOS DOS MEIOS DOS CONTROLE E-CPPI E VS+EL PARA GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DO *Geobacillus stearothermophilus*

| CONSTITUINTES              | QUANTIDADE<br>g/1000 mL |               | PREÇO / QUILO<br>R\$ | PREÇO TOTAL<br>R\$ |               |
|----------------------------|-------------------------|---------------|----------------------|--------------------|---------------|
|                            | Meio<br>E-CPPI          | Meio<br>VS+EL |                      | Meio<br>E-CPPI     | Meio<br>VS+EL |
| TSB*                       | 30,0                    | ---           | 211,40               | 6,34               | ---           |
| Cloreto de cálcio          | 0,18                    | 0,18          | 545,00               | 0,098              | 0,098         |
| Amido                      | 1,0                     | 1,0           | 30,20                | 0,03               | 0,03          |
| Púrpura de bromocresol     | 0,01                    | 0,01          | 139,00               | 0,001              | 0,001         |
| Extrato de leveduras       | ---                     | 8,0           | 365,00               | ---                | 3,45          |
| Vinhaça de soja (mL)       | ---                     | 14,3          | zero                 | ---                | zero          |
| Água purificada            | 1000 mL                 | 1000 mL       | 0,40 / litro         | 0,40               | 0,40          |
| <b>Custo Total / litro</b> | <b>---</b>              | <b>---</b>    | <b>---</b>           | <b>6,87</b>        | <b>3,98</b>   |

NOTA: TSB (tripticase soy broth)

FONTE: O Autor (2008)

Para a produção de um lote de Indicador Biológico com 4000 unidades, são necessários 12,0 litros de meio para a germinação dos esporos, custando R\$ 82,44 se produzido com a formulação do meio E-CPPI e R\$ 47,76 com o meio utilizando o resíduo da agroindústria (vinhaça de soja). Ocorrendo uma redução de 42,97% no custo do meio de recuperação dos esporos, impactando numa redução de 5,36% (ANEXO 1) no custo do lote de IB.

## 6 DISCUSSÃO

A temática dos resíduos agroindustriais é um campo de ampla investigação. Contudo, há pouca produção teórica em relação ao emprego de subprodutos e/ou resíduos da agroindústria na produção de produtos a serem utilizados nos cuidados com a saúde humana. A idéia inovadora de empregá-los na produção do meio de cultura para a germinação dos esporos utilizados como indicadores biológicos da efetividade dos processos de esterilização, procurou aliar a minimização do impacto ambiental com a diminuição dos custos de produção.

Indicadores biológicos (IB) para o monitoramento de esterilizações pelo calor úmido sob pressão (autoclaves), têm sido produzidos a partir de suspensões aquosas de esporos termorresistentes do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (USP 29, 2006). A termorresistência dos esporos bacterianos está relacionada entre outros fatores, à composição do meio de cultivo e temperatura de incubação durante a esporulação. Além de fontes de nitrogênio e carbono como extrato de leveduras, extrato de carne, peptona ou triptona, a presença de sais indutores da esporulação, como íons magnésio, manganês, fosfato e cálcio são importantes na formação do esporo (FRAZIER E WESTROF, 1985; MOLIN, 1982; OLSON, 1980). A presença de íons cálcio é fator determinante na produção de esporos termorresistentes (KUJALA, 1982).

As análises realizadas, dentro das condições descritas neste trabalho, para obtenção de esporos termorresistentes a partir de meios compostos por resíduos da agroindústria demonstraram que o bagaço de cana-de-açúcar não apresentou boas condições para a multiplicação e esporulação do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. A casca de soja pode ser um potencial substrato, porém uma investigação mais minuciosa deve ser realizada para validar os dados obtidos.

Como o foco principal deste trabalho foi a germinação dos esporos danificados pelo calor, optou-se por trabalhar com um meio de esporulação já padronizado para evitar que as características da suspensão de esporos fossem mais uma variável a ser testada, interferindo nos resultados com os meios germinativos.

A padronização da concentração de esporos antes do seu emprego na produção de IB é importante para a prévia avaliação do comportamento dos esporos quando submetidos às condições de esterilização. Ajustando-se desta maneira os

valores de  $U_{SK}$  e  $D_{121^{\circ}C}$  para os recomendados pelas bibliografias oficiais. A USP 29 (2006) recomenda que os valores de  $D_{121^{\circ}C}$  estejam entre 1,5 e 3 minutos, o FDA (2001) e a ISO 11138-3 (1995) fazem referências apenas ao valor mínimo de 1,5 minutos.

O valor para o tempo médio de morte ( $U_{SK}$ ) não deve ser superior a 15 minutos segundo a DIN 58946 (1982). A USP 29 (2006) indica que  $U_{SK}$  não deve ser superior ao tempo de morte, calculado por:  $D (\log N_0 + 4)$ , enquanto a USP 22 (1990) sugere um valor de  $U_{SK}$  mínimo de oito minutos. A determinação do  $U_{SK}$  deve considerar o tempo médio de esterilização que os usuários do IB costumam empregar. Este cuidado evita que tempos de autoclavação inferiores ao determinado para  $U_{SK}$  sejam utilizados, pois poderiam invalidar os ciclos, favorecendo resultados positivos para os IB. A produção e padronização dos cinco lotes de suspensão de esporos realizados nesta pesquisa, atendem a todos os requisitos supra citados onde conclui-se que o meio padronizado pelo CPPI utilizado para a produção da suspensão aquosa de esporos, contém os componentes necessários para a esporulação. Este forneceu uma boa produção de esporos termorresistentes (população entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

O princípio básico dos IBs é a obtenção de uma população de esporos conhecida, padronizada e resistente ao processo de esterilização. A sobrevivência ou não destes esporos indicará a eficácia do procedimento no ciclo de esterilização. Tão importante quanto obter esporos termorresistentes, é ter um meio de cultura que forneça condições aos possíveis esporos sobreviventes e danificados pela ação do agente esterilizante de germinar. Evitando a obtenção de resultados satisfatórios de maneira equivocada (falsos negativos), se o meio for incapaz de fornecer condições para a germinação.

Para a verificação da efetividade do processo de esterilização, o uso de *Soybean Casein Digest Medium* em IB no qual os esporos encontram-se em tiras de papel é recomendado (USP 29, 2006). Quando se trata de IB autocontidos, cabe ao produtor garantir a eficácia do meio em favorecer a germinação dos esporos danificados, porém sobreviventes ao processo de esterilização (USP 29, 2006).

Os meios testados no conjunto de experimentos foram sempre aliquotados em frascos-ampola num volume de 3,0 mL/frasco, para reproduzir a forma de apresentação do IB Esteriteste-CPPI, utilizado como padrão durante os ensaios.

A produção de indicadores biológicos para o controle de processos de esterilização é norteadada por bibliografias oficiais, que fornecem parâmetros e metodologias de análise (USP 24, 2000; USP 29, 2006; FDA, 2001; ISO 11138,1995).

Quando se trata de um indicador biológico autocontido, deve-se considerar que além da verificação da termorresistência dos esporos, o efeito do processo de esterilização no meio de recuperação avaliado, pois o meio acaba sendo esterilizado duas vezes: uma quando é produzido e outra quando utilizado como IB (FDA, 2001; USP 24, 2000). Levando-se em consideração tal fato, foram realizados os testes recomendados pela USP 24 (2000) para verificar a habilidade do meio em manter suas características iniciais após exposição adicional às condições de esterilização (15 minutos). Sendo ainda executados ensaios para determinar a capacidade do meio em promover a germinação após exposição aos tempos de sobrevivência de 5 minutos e a um tempo médio de morte de 15 minutos, bem como viabilidade e pesquisa de contaminantes (USP 29, 2006).

Realizados de maneira preliminar, estes ensaios permitiram perceber que os meios produzidos com a vinhaça de cana-de-açúcar nas concentrações estudadas (1:25, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 e 1:100), forneceram resultados satisfatórios para a viabilidade, tempo de sobrevivência de cinco minutos e tempo de morte de 15 minutos. Porém no estudo da influência do tempo adicional de esterilização de 15 minutos, os resultados foram insatisfatórios, pois os meios sofreram alteração na coloração sem o crescimento microbiano, podendo induzir a falsos resultados positivos.

O melaço de cana-de-açúcar nas concentrações estudadas (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:600), não ofereceu condições suficientes para a germinação dos esporos danificados, fornecendo resultado insatisfatório para todos os testes realizados.

O melaço de soja nas condições estudadas (1:25, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 e 1:100), não apresentou bom desempenho na germinação dos esporos, pois apesar de fornecer resultados satisfatórios para o estudo de viabilidade e tempo de sobrevivência (TS- 5 minutos) nas concentrações 1:200, 1:400 e 1:600, os resultados no tempo adicional de esterilização do meio (15 minutos), não foram adequados para as mesmas concentrações. Os resultados para as concentrações 1:25, 1:50 e 1:100 foram insatisfatórios em todos os testes.

Dos meios estudados de maneira preliminar, a vinhaça de soja forneceu resultados satisfatórios em todas as análises, promovendo a germinação dos esporos danificados pelo calor, com resultados muito semelhantes ao meio sintético utilizado na produção do Esteriteste-CPPI. Portanto, foram realizados mais ensaios com esta matéria prima, procurando otimizar a formulação.

A USP 29 (2006) recomenda que sejam realizados os testes de viabilidade, contagem de esporos viáveis totais, determinação de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ , janela de sobrevivência/morte (TS-5 minutos e TM-15 minutos) e o valor de Z dos indicadores biológicos, para que possam ser validados para uso em monitoração de processos de esterilização.

O uso de um resistômetro para realizar os testes de resistência térmica (BIER-*biological indicator evaluator resistometer*) é recomendado pela USP 29 (2006), FDA (2001) e ISO 11138-1 (1995), porém o custo do equipamento é muito elevado dificultando o acesso. O FDA (2002) recomenda que no caso da impossibilidade do uso do BIER, pode-se utilizar um esterilizador (autoclave para a determinação da resistência ao calor úmido sob pressão), desde que este equipamento tenha os parâmetros de temperatura e pressão, devidamente controlados. Portanto, os testes para determinação dos valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  (tempo de termodestruição) e  $U_{\text{SK}}$  (tempo médio de morte) foram realizados em autoclave horizontal gravitacional, pois reflete a realidade dos usuários dos IB nos postos de saúde e laboratórios da rede pública de saúde do estado do Paraná, que são os principais usuários do IB - Esteriteste. O equipamento usado nas análises é submetido a controles internos rotineiros (uso de IB) e externos anualmente com a calibração do manômetro.

Os valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{\text{SK}}$  foram obtidos por cálculo, aplicando-se o método da fração negativa Spearman-Kaber (USP 29, 2006; ISO 11138-1,1994). Esta metodologia é a mais apropriada para IB que se apresentam na forma de frascos-ampola, pois a acentuação da variação inicial da curva de morte ocasionada pelo tempo gasto para que a pressão no interior do frasco se iguale à pressão da câmara, é atenuado pelo uso da média das determinações de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  em diferentes tempos de exposição, apresentando também maior sensibilidade na detecção de um número muito baixo de microorganismos (SELLA, 1995). Como o recomendado, foi utilizado o mesmo número de amostras expostas a cada tempo de autoclavação (10



amostras), bem como a aplicação de Intervalos iguais entre os tempos de aquecimento (2,5 minutos) (USP 29, 2006; SELLA, 1995).

O teste de termorresistência teve por objetivo determinar os valores de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{\text{SK}}$  avaliando a resistência dos esporos ao processo de esterilização e de maneira indireta a capacidade germinativa do meio de cultura.

A quantificação dos esporos totais através da contagem de células viáveis pelo método pour-plate após choque térmico, é recomendada pela USP 29 (2006).

Porém os estudos realizados demonstraram que o método da micro-gota, pode ser empregado na quantificação de esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. A substituição de metodologia gera economia de material e tempo na execução das análises, sem acarretar prejuízo nos resultados. Tal fato acaba refletindo na diminuição do tempo de produção e no custo final dos IB, pois antecipa os resultados em até 24 horas e barateia os controles de qualidade executados.

O método de inoculação na superfície do ágar apresentou maior facilidade de execução e leitura. A metodologia oficial emprega uma placa por diluição e incubação por 48 horas. Já o método proposto possibilita a inoculação de até quatro diluições por placa e o tempo de incubação de 18 a 24 horas.

A opção por diminuir o tempo de incubação se deu após várias análises terem sido feitas com leituras nos dois tempos (24 e 48 horas), não sendo observada diferença na quantificação das células viáveis, somente no aspecto das placas.

A formação de colônias grandes e difusas, que podem tornar-se confluentes, impossibilitando a contagem, citada por Everal & Morris, 1978, foram observadas quando as placas foram incubadas por 48 horas. Com a redução do tempo de incubação para 24 horas, o *Geobacillus stearothermophilus* formou apenas colônias pequenas e discretas, possibilitando as leituras com facilidade. O menor tempo de incubação também evitou que ocorressem fissuras e o ressecamento do meio de contagem.

Assim como YAZDANY e LASHKARI (1975) citam em seus estudos que não observaram diferenças na contagem de colônias do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 com e sem choque térmico, os estudos revelaram que para a amostragem estudada, também não foram encontradas diferenças significativas. Permitindo a redução de mais uma etapa da metodologia de quantificação de células viáveis.

Segundo Sella (1995) o tempo de incubação do segundo repique para a produção de suspensão de esporos deve ser de 18 horas. Na cinética de crescimento do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, observou-se que o final da fase logarítmica foi com 6 horas de incubação, sendo esta fase a mais indicada para a obtenção de esporos termorresistentes. Estes dados permitem diminuir o tempo de incubação do inóculo para 6 horas.

O emprego de uma suspensão aquosa de esporos testada e padronizada garantiu a termorresistência adequada para o desenvolvimento dos estudos, possibilitando a avaliação dos meios germinativos.

A autoclavação com um tempo sub-letal foi aplicada, para danificar os esporos sem eliminá-los totalmente, permitindo o estudo da recuperação destes esporos nos meios testados.

O tempo de oito minutos de autoclavação (subletal) usado para danificar os esporos, foi escolhido baseando-se no valor de  $U_{sk}$  (13,4 minutos) do meio VS+EL (0,8 g%), correspondendo em média a 60% do tempo médio de esterilização necessário para eliminar toda a população de esporos.

Dos meios testados produzidos com vinhaça de soja em substituição ao TSB, as duas diluições extremas, 1:25 e 1:100, não forneceram resultados satisfatórios, provavelmente por uma questão de ajuste nas concentrações de nutrientes, pois tanto a carência quanto o excesso de determinados elementos podem causar inibição no desenvolvimento microbiano. As concentrações 1:60 e 1:70 apresentaram os melhores resultados, obtendo-se os valores médios de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  em 2,9 minutos para ambos, sendo superiores até mesmo ao padrão-CPPI com 2,6 minutos. A concentração 1:70 foi a escolhida para a realização dos demais testes por ser a maior diluição que apresentou os melhores resultados.

Os meios produzidos com vinhaça de soja apresentaram leve acidificação após a autoclavação alterando a coloração, tornando o meio desbotado. A aparência do meio foi melhorada pela adição do extrato de leveduras que manteve a coloração mais intensa, e reduziu-se a oscilação do pH após a esterilização por autoclave.

A presença de extrato de leveduras no meio de revelação também implementou a germinação dos esporos, sendo observado o aumento no valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  de 1,88 minutos no meio VS 1:70 sem extrato de leveduras, para 3,23 minutos no meio VS 1:70 com 0,8g% de extrato de leveduras, sendo esta a concentração com o melhor resultado.

A USP 29 (2006) determina que o tempo de sobrevivência e o tempo de morte não devem ser inferiores a 4,5 minutos e 13,5 minutos, respectivamente. E não devem ultrapassar a 14 minutos para o tempo de sobrevivência e 32 minutos para o tempo de morte. Os resultados obtidos com os meios: VS (TS = 4,2 minutos e TM = 20,5 minutos), VS+EL (TS = 6,6 minutos e TM = 24,2 minutos) e E-CPPI (TS = 6,5 minutos e TM = 24,0 minutos) demonstram mais uma vez o incremento na termorresistência dos esporos causado pela presença do extrato de leveduras no meio composto pela vinhaça de soja.

A necessidade de exposição a um maior tempo para inativar os esporos suspensos no meio contendo o extrato de leveduras, provavelmente deve-se à considerável quantidade de proteínas presentes, as quais têm um efeito protetor nos microorganismos sobreviventes ao processo de esterilização (ICIEK; BLASZCZYK e PAPIEWSKA, 2008).

O meio ágar E-CPPI modificado forneceu os melhores resultados quando da quantificação de esporos avariados pois, apresentou a capacidade de germinar os esporos suspensos no caldo E-CPPI e no caldo VS-1:70. Apesar de Mikolajacik e Rajkowski (1980) e USP 29 (2006) recomendarem o uso do TSA na recuperação dos esporos danificados, nossos estudos não demonstraram resultados satisfatórios na aplicação deste meio.

A utilização da vinhaça de soja centrifugada não representou melhoria nas condições de germinação dos esporos, portanto esta etapa de preparo da matéria-prima foi abandonada no avanço dos estudos.

Durante a cinética de germinação dos esporos suspensos nos meios com a vinhaça de soja, observou-se que a partir da décima segunda hora, os bacilos germinados voltaram a esporular. Provavelmente a escassez de nutrientes, o pH ácido e elementos traços provenientes do meio complexo tenham tido papel importante neste fato. O mesmo não ocorreu com ao meio padrão CPPI. Este fato pode ser melhor estudado e aplicado futuramente no desenvolvimento e otimização de meio líquido utilizando resíduos agroindustriais para a obtenção de esporos termorresistentes do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953.

A presença de amido solúvel na concentração de 0,1g% na formulação do meio com vinhaça de soja 1:70 com extrato de leveduras, não significou maior capacidade germinativa do meio, contradizendo BROWN (1988); ZECHMAN e PFLUG (1991); LOPEZ *et al.* (1997); LABBE (1979); COOK e BROWN (1965); COOK

e GILBERT (1968); PENNA (2000); MALLIDIS e SCHOLEFIEL (1986). Estes autores dão ao amido a propriedade de adsorver ácidos graxos livres que poderiam dificultar a germinação dos esporos danificados pelo calor.

O amido foi mantido na formulação, pois não foram realizados estudos completos da estabilidade e a longo prazo sua presença pode realmente interferir nas condições do meio, favorecendo a germinação dos esporos mais velhos quando danificados pelo calor.

Estudos complementares são necessários para melhor avaliar o aumento na concentração de proteínas e glicose nas três primeiras horas da cinética de germinação dos esporos quando inoculados no meio padrão-CPPI. Coincidentemente, este fenômeno acontece no período onde ocorre a germinação total dos esporos. Provavelmente o *Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953, libere enzimas necessárias à germinação e devido a sua atividade amilásica, metabolize o amido presente na formulação.

Verificou-se que o valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  passou de  $2,76 \pm 0,19$  minutos para  $1,73 \pm 0,29$  minutos e o valor de  $U_{sk}$  de  $13,65 \pm 0,94$  minutos abaixou para  $8,55 \pm 0,33$  minutos quando o cloreto de cálcio foi retirado da formulação do meio. A presença do cloreto de cálcio no meio para a germinação dos esporos danificados pelo calor contribuiu para o aumento no valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  e  $U_{sk}$ , confirmando a colocação de Sasaki *et al.* (2000) e Penna (2000). Segundo Setlow (2007), o cloreto de cálcio induz a formação de SASP (proteínas ácido resistentes), que auxiliam na regeneração do DNA das células danificadas. Apesar de Lopez *et al.* (1997) recomendarem o emprego de 100 ppm (0,01%) de cálcio no meio de germinação, a concentração de 0,018% foi mantida, pois estudos anteriores, no desenvolvimento do Esteriteste, demonstraram que esta concentração apresentou bons resultados (PARANÁ, 2003).

Nos estudos realizados para a verificação da influência do pH na germinação dos esporos danificados pelo calor, observou-se que no meio VS+EL 1:70, o valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  foi elevando-se à medida que o pH aumentou. Passando de  $1,24 \pm 0,15$  minutos no pH 6,0 para  $3,38 \pm 0,29$  minutos no pH 7,3. No meio padrão E-CPPI este aumento foi percebido até o pH 7,1 passando de  $1,74 \pm 0,32$  minutos no pH 6,0 para  $3,22 \pm 0,19$  minutos no pH 7,1 ocorrendo pequeno decréscimo para  $2,76 \pm 0,20$  minutos quando o pH foi ajustado para 7,3. Estas observações confirmam as colocações de Penna *et al.* (2000), que em condições ácidas ocorre a diminuição

da termorresistência (com redução no valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$ ), produção de esporos e tempo de estocagem, pois a acidez é responsável pela remoção parcial do cálcio do esporo.

Apesar de não terem sido realizados estudos para verificação da atividade da alfa galactosidase, na cinética de germinação dos esporos danificados pelo calor e suspensos no meio VS+EL, observou-se o consumo de rafinose e estaquiose, confirmando os estudos de Porte *et al.* (1992), que descreveram o consumo de rafinose e estaquiose comprovando a capacidade do *Bacillus stearothermophilus* de produzir a glicoproteína  $\alpha$ -galactosidase.

Os valores médios de Z encontrados para os meios estudados, E-CPPI e VS 1:70+EL (0,8g%), de  $8,57^{\circ}\text{C}$  e  $10^{\circ}\text{C}$  respectivamente, encontram-se dentro do recomendado pela ISO 11138-3 (1995), que determina valores superiores a  $6,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

A validação do meio para germinação dos esporos avariados pelo calor, foi realizada com quatro lotes de vinhaça e três lotes de concentrado de esporos, segundo a recomendação do FDA (2001) seriam necessários três lotes. Todos os lotes de vinhaça estudados apresentaram resultados satisfatórios, comprovando a capacidade da vinhaça de soja em promover a germinação dos esporos avariados pelo calor. Concluindo que partindo-se de um lote de vinhaça que apresente as seguintes características: carboidratos totais entre 4,74 a 11,79 g%, proteínas na faixa de 1,16 a 2,11 g% e graus Brix entre 14 e 17, sendo diluída a 1:70 poderá ser produzido um meio de cultura que forneça condições favoráveis de germinação dos esporos danificados pelo calor em substituição ao TSB.

No estudo parcial de estabilidade do meio produzido com vinhaça de soja e extrato de leveduras (VS 1:70+EL), observou-se um decréscimo no valor de  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  de  $2,8 \pm 0,12$  minutos para  $2,1 \pm 0,22$  minutos, no valor de Usk de  $13,60 \pm 0,59$  minutos para  $10,8 \pm 0,8$  minutos, no valor de TS de 7,56 minutos para 5,6 minutos e no valor de TM de 24,36 minutos para 18,2 minutos após doze meses produção. Este resultado é considerado satisfatório, pois é esperada uma perda gradual da termorresistência dos esporos com o tempo de prateleira do produto. O importante é que os parâmetros avaliados encontrem-se dentro dos valores preconizados. As análises devem ser repetidas a cada três meses até a conclusão do estudo da estabilidade, ou seja, quando os parâmetros avaliados estiverem abaixo do recomendado. O prazo de validade fixado em três meses antes do primeiro

resultado insatisfatório. Os estudos devem ser repetidos com três lotes consecutivos ou cinco alternados para se obter um resultado definitivo. O Esteriteste possui prazo de validade de doze meses. Geralmente os IB biológicos autocontidos apresentam validade menor que os que apresentam a suspensão de esporos em tiras de papel. Provavelmente o motivo seja a manutenção dos esporos em uma condição de baixa umidade.

No meio padrão CPPI composto por: TSB, 3,0 g%, cloreto de cálcio, 0,018 g%, amido solúvel, 0,1 g% e púrpura de bromocresol, 0,001 g%, o TSB representa 98% do custo. Quando a vinhaça de soja substituiu este componente na formulação, os resultados se mostraram melhores com o acréscimo do extrato de leveduras. A substituição do TSB pela VS+EL (vinhaça de soja + extrato de leveduras) impacta numa queda de 98% para 72% de participação nos custos do produto final, sendo ainda um valor significativo quando se trata de redução de custos de produção.

Os custos de produção de IB com o meio composto por vinhaça de soja, apresentou-se 5,36% menor que o meio padrão CPPI. Considerando-se que o Esteriteste é 20% mais barato que os similares apresentados no comércio, pode-se gerar uma economia de 25,36% para o Estado do Paraná com a aquisição de IB, utilizando-se resíduo da agroindústria como matéria-prima, algo em torno de R\$ 570.600,00/ano. Além de reduzir a dependência de importação de matéria-prima industrializada.

Com o aumento da escala de produção do IB, esta substituição poderá ter um impacto ainda maior na redução do custo final do IB, pois haverá conseqüente aumento do número de unidades/lote, reduzindo o custo com o controle de qualidade/unidade, fator que mais onera o produto final.

## 7.0 CONCLUSÃO

- A contagem de colônias pelo método de inoculação em superfície por microgotas substitui com vantagens o método *pour-plate* reduzindo em 24 horas o tempo de leitura e com economia de 75% no número de placas de meio cultura;
- Não há diferenças significativas na quantificação de células viáveis (esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953) com e sem aplicação de tratamento térmico prévio na produção de indicadores biológicos;
- A vinhaça de soja com concentração inicial de 14° Brix a 17° Brix, diluída em 70 vezes, acrescida de 0,8g% de extrato de leveduras, pode substituir o TSB no meio padrão para germinação dos esporos do *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, danificados pelo calor úmido sob pressão;
- A vinhaça de soja como meio de cultura nos indicadores biológicos é viável economicamente, pois agrega o baixo custo de um resíduo da agroindústria alimentar à efetividade na germinação de esporos danificados;
- Há necessidade de pesquisas complementares com vinhaça de soja na produção de Indicadores referentes à estabilidade no tempo de prateleira, tempo de incubação para leitura e mudança de escala da produção.

## 8.0 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

SELLA,S.R.B.R.; DLUGOKENSKI,R.E.F.; FURIE,C.; VANDENBERGUE,L.P.S;  
MEDEIROS,A.P.;SOCCOL,C.R. Modificação da metodologia oficial (USP) para  
contagem total de esporos viáveis em Indicadores Biológicos para Esterilização. In:  
24° Congresso Brasileiro de Microbiologia,2007, Brasília. **Anais do 24º Congresso  
Brasileiro de Microbiologia**,2007. Brasília: GRAFFITI,2007.v. CD.p.1-1.  
Classificação do evento: Nacional; Brasil/Português; Meio de divulgação: Magnético

DLUGOKENSKI, R.E.F.; SELLA,S.R.B.R.; GUIZELINI,B.P.; MINOZZO,J.C.;  
SOCCOL,C.R. Emprego de resíduo agroindustrial (vinhaça de soja) na germinação  
de esporos danificados pelo calor úmido sob pressão. In: Fórum Internacional do  
Complexo Agroindustrial Orgânico e Biotecnologias da Orgânica 2008, Curitiba.  
**Anais do Orgânica 2008**. Curitiba: Classificação do evento: Internacional;  
Curitiba/Português; Meio de divulgação: Eletrônico  
Prêmio CIÊNCIA ORGÂNICA 2008, referente ao segundo lugar geral.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. M.; BUSTA, F. F. Ultrahigh-Temperature Activation of a Low-temperature *Bacillus subtilis* Spore Germination System. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 418-423, 1972.
- ADAMS, D.M. Heat injury of bacterial spores. **Applied microbiology**, v. 23, p.245-261, 1978.
- AGUIAR, C. L. Ciclodextrina Glicosiltransferase, Produção, Ação e Aplicação. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v.19, n.1, p.119-138, 2001.
- AliBio WA. Disponível em: [www.google.com.br/search?hl=pt-BR&q=ALIBIO+WA&btnG=Pesquisa+Google&meta](http://www.google.com.br/search?hl=pt-BR&q=ALIBIO+WA&btnG=Pesquisa+Google&meta). Acesso em 09/02/08.
- AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE. **ANSI/AAMI ST 34**: Guideline for the use of ethylene oxide and steam biological indicators in industrial sterilization process, Washington, 1991.
- AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE. **ANSI/AAMI ST 46**: Steam Sterilization and Sterility Assurance in Health Care Facilities, Arlington, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS-ABNT. **NBR ISO 11134** Esterilização de Produtos Hospitalares - Requisitos para Validação e Controle de Rotina - Esterilização pelo Calor Úmido. São Paulo, 2001.
- AYUB, M. A. Z. *et al.* **Conversão de resíduos agroindustriais da soja em etanol e outros solventes orgânicos**. Relatório parcial PSPPG, processo 520712/99-4, 2002. Disponível em: [http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/Projetos%20Plano%20Sul/ufrgs\\_relatorio2002.htm](http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/Projetos%20Plano%20Sul/ufrgs_relatorio2002.htm). Acesso em: 20/ 10/ 2006.
- BEAMAN, T. C.; GREENAMYRE, J. T.; CORNER, T. R.; PANKRATZ, H. S.; GERHARDT, P. Bacterial Spore Heat Resistance Correlated with Water Content, Wet Density, and Protoplast/Sporoplast Volume Ratio. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 870-877, 1982.
- BEAMAN, T. C.; KOSHIKAWA, T.; PANKRATZ, H. S.; GERHARDT, P. Dehydration Partitioned within Core Protoplast Accounts for Heat Resistance of Bacterial Spores. **FEMS Microbiology Letters**, v. 24, p. 47-51, 1984.
- BEAMAN, T. C.; GERHARDT, P. Heat Resistance of Bacterial Spores Correlated with Protoplast Dehydration, Mineralization, and Thermal Adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p.1242-1246, 1986.
- BROWN, G. D.; GAZE, J. E. The Evaluation of the Recovery Capacity of Media for Heat-treated *Bacillus stearothermophilus* Spore Strips International. **Journal of Food Microbiology**, Elsevier, v.7, p.109-114, 1988.

BROWN, K. L. Spore Resistance and Ultra Heat Treatment Processes. **Journal of Applied Bacteriology Symposium**, v. 76, p. 67S-80S, 1994.

CARLBERG, D. M. **Cleanroom Microbiology for the Non-Microbiologist**, 2nd ed., p. 40-51, Boca Raton, 2005.

CAZEMIER, A. E.; WAGENAARS, S. F. M.; STEEG, P.F. Effect of Sporulation and Recovery Medium on the Heat Resistance and Amount of Injury of Spores from Spoilage Bacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 761-770, 2001.

COOK, P.G. The Effect of Heat and Glucose on Endogenous Endospore Respiration Utilizing a Modified Scholander Microrespirometer. **Journal of Bacteriology**, v.63, p.193-198, 1952.

COOK, A.M.; BROWN, M.R. Relationship Between Heat Activation and Percentage Colony Formation for *Bacillus stearothermophilus* Spores: Effects of Storage and pH of the Recovery Medium. **Journal of Applied Bacteriology**, v.28, n.3, p.361-364, 1965.

COOK, A.M.; GILBERT, R.J.; Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Journal of food technology**, v.3, p.285-293, 1968.

CROWE, J.; CROWE, L.; CARPENTER, J.; WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemistry Journal**, v. 242, p. 1-10, 1987.

DEL BIANCHI, V.L.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O. Fermentação em estado sólido. In: **Biotecnologia Industrial**, v. 2, p. 247-276, 2001.

DEUTCHENORM. DIN 58946. **Dampf-sterilisatoren für medizinische sterilisiergüter; bio-indikatoren**. Berlin, 1982.

DE VRIES, Y.P. The role of calcium in bacterial spore germination. **Microbes Environ**, V.19, n.3, p.199-202. 2004.

De Vries Y. P. *Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination. Thesis Wageningen University, Wageningen, the Netherlands – with summary in Frisian and Dutch, 128 p. ISBN – 90-8504-369-7, 2006. Disponível em: <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3903.pdf>.

EDWARDS, J. L.; BUSTA, F. F.; SPECK, M. L. Heat injury of *Bacillus subtilis* spores at ultrahigh temperatures. **Applied Microbiology**, v.13, p. 858-864, 1965.

ESKIN, N. A. M. et al. A study of oligosaccharides in a select group of legumes. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v.13, n.1, p.40-42, 1989.

EVERAL, P.H.; MORRIS, C.A. Quantitative Recovery of Spores from Thermophilic Spores Papers. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 423-425, 1978.

FEEHERRY, F. E.; MUNSEY, D. T.; ROWLEY. Thermal inactivation and injury of *Bacillus steaothermophilus* spores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 365-370, 1987.

FOESTER, H.A. Activation and Germination Characteristics Observed in Endospores of Thermophilic Strains of Bacillus, **Microbiology**, vol. 134, p.175-181, 1983.

FONZI, M. *et al.* Morpho-structural variations of bacteria after in steam vaccum assisted autoclave. **Bull Group Int. Rech. Science. Stomatology. Odontology**, v. 41, p.124-130, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Premarket Notification [5210(k)] for Biological Indicators Intended to Monitor Sterilizers used in Heath Care Facilities**: Draft Guidance for Industry and FDA reviewers, 2001.

FRAZIER, W. C.; WESTROF, D.C. **Microbiologia de los Alimentos**, 3th ed., Zaragoza:Acirbia, p.96-105, 1985.

GERHARDT, P.; MARQUIS, R. E. Spore Thermoresistance Mechanisms. In: Regulation of Prokaryotic Development. **American Society for Microbiology**, Washington, DC, p. 43-46, 1989.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C.A.; ROCHA, S.N. E SOCCOL, C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003,

GONZÁLES, I.; LÓPEZ, M.; MATNEZ, S.; BERNARDO, A; GONZÁLEZ, J. Thermal Inactivation of *Bacillus cereus* Spores Formed at Different Temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.51, p.81-84, 1999.

GOULD, G. W. Water and the Survival of Bacterial Spores. In **A. C. Membranes, Metabolism and Dry Organisms**. Cornell University Press, Ithaca, USA, p.143-156, 1986.

GUZMAN, A.; FIELDS, M. L.; HUMBERT, R. D.; KAZANAZ, N. Sporulation and Heat Resistance of *Bacillus Stearothermophilus* Spores Produced in Chemically Defined Media. **Journal of Bacteriology**, p. 775-776, 1972.

HALVORSON, H.; HOWITT, C. The Role of DPA in Bacterial Spores,. In **H. O. Spores**, v. 2, p. 149-165, 1961.

HASHIMOTO, T.; FRIEBEN, W.R.; CONTI, S.F. Germination of Single Bacterial Spores. **Journal of Bacteriology**, Lexington, v. 98, n. 3, p. 1011-1020, 1969.

HOLCOMB, R. G; PLUG, I. J. Performance of Biological Indicators Designed for Moninoring Wet-heat Sterilization Processes. In **Sterile Disposable Devices Update. "73 Technical Symposium**. October 17-18. Health Industries Association. Washington, D.C, p.136-151, 1973.

ICIEK,J.; BLASZCZYK,I.; PAPIEWSKA,A. The effect of organic acid type on thermal inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p.16-20, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ- IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4ªEd., Brasília, ANVISA, 2005.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - **ISO 14161**. Sterilization of Health Care Products – Biological Indicators – Guidance for the Selection, Use and Interpretation of Results. Geneva, 2000.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - **ISO 11138-1**. Sterilization of Health Care Products – Biological Indicators- Part 1: General. Switzerland, 1 ed., 1994.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - **ISO 11138-3**. Sterilization of Health Care Products – Biological Indicators. Part 3: Biological Indicators for Moist Heat Sterilization. Geneve, 1995.

INTERNACIONAL FEDERATION OF THE PHARMACEUTICAL INDUSTRIES. Validation and Control of Non-standard Sterilization Process. J. Parenter. **Science Technology**, Philadelphia, v. 47, vol.1, p. 1-15, 1993.

JOSLYN, L. Sterilization by heat. In: **BLOCK, Seymour S. Desinfection, sterilization and preservation**, 3 ed., London: Lea & Feberger, p. 1-41, 1983.

KELSEY,J. C. The Testing of Sterilizers. Thermophilic spore papers. **Journal Clinical Pathology**. 14, p. 313-319, 1961.

KEYNAN, A.; EVENCHIK, Z. **Activation in the bacterial spore**, ed.Gould,G.W. and Hurst, A, p.357-396, Londres,1969.

KIYNAN, A.; EVENCHIK, Z.; HALVORSON, H.O.; HASTINGS,J.W. Activation of Bacterial Endospores. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 2, p.313-318, 1964.

KUBO, M.; OKAJIMA, J.; HASUMI, F. Isolation and characterization of soybean waste-degrading microorganisms and analysis of fertilizer effects of the degraded products. **Applied an Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p. 242-247, 1994.

KUJALA, T.; KAUPPINEN,V. Some Improvements in the Production of *Bacillus stearothermophilus* Spores for Sterilization Control. **Acta Pharm. Fenn**, v. 91, p. 75-83, 1982.

LABBE, R.G. Recovery of Spores of *Bacillus stearothermophilus* from Thermal Injury. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 47, p.457-462, 1979.

LEBOFFE, M. J.; PIERCE, B. E. Spore Stain. IN: **A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory**, 2 ed, Morton Publishing Company, p. 32-33,1996.

LEWIS, R.G. Practical Guide to Autoclave Validation. **Pharmaceutical Engineering**, july/august, 2002

LI, X.; YANG, P.; PAN, P.; ZUO, F.; JIN, F. Factors Regulating Production of Alfa Gactosidase from *Bacillus* sp. JF<sub>2</sub>. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 1-4, 1997.

LOPEZ, M. *et al.* Influence of Recovery Conditions on Apparent Heat Resistance of *Bacillus stearothjermophilus*. **International Journal of Food Science and Technology**, V. 32, p.305-311, 1997.

MALLIDIS, C.G.; SCHOLEFIEL,J. Evaluation of Recovery Media for Heated Spores of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, p. 517-523, 1986.

MARQUIS, R.E.; BENDER, G.R. Mineralisation and Heat Resistance of Bacterial Spores. **Journal of Bacteriology**, v. 161, p. 789-791, 1985.

MAITY, T. K. ; PAUL, S. C. Low-oligosaccharide soy milk: application of alpha-galactosidase for hydrolyzing soy-oligosaccharide. **Indian Dairyman, New Delhi**, v. 43, n.10, p.443-448, 1991.

MOIR, A. How do spores germinate? **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p. 1-5, 2006.

MOLIN, G. Destruction of Bacterial Spores by Thermal Methods. In: RUSSEL,A.D.; HUGO,W.B.; JAYLIFFE,G.A. Principles and Pratic of Desinfeccion, Preservation and Sterilization. Oxford: Blackwell, p. 454-463, 1982.

MILLER, M. D.; SHEDRAKE, M. A. The ability of biological indicators to detect sterilization failures. **Am. J.Dent.**, v.7, n.2, p.95-97, 1994.

Morfologia e ultraestrutura bacterianas (Parte 3). Disponível em: <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/morfologia3/morfologia3.html>. Acesso em: 05/08/08.

MULIMANI, V. H.; THIPPESWAMY, S.; RAMALINGAM. Enzymatic degradation of oligosaccharides in soybean flours. **Food Chemistry,Oxford**, v.59, n.2, p.279-282, 1997.

MURRELL, W. G.; WARTH A. D. Composition and Heat Resistance of Bacterial Spores, In **L. L. Campbell and H. O. Spores**, v. 3, p. 1-25, 1965.

NAKASHIO, S.; GERHARDT, P. Protoplast Dehydration Correlated with Heat Resistance of Bacterial Spores. **Journal of Bacteriology**, v.162, p. 571-578, 1985.

NAZINA, T.N. *et al.* Taxonomic Study of Aerobic Thermophilic Bacilli: Descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen.nov.,sp.nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from Petroleum Reservoirs and Transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus*

*thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new Combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 433 - 446, 2001.

NELSON, F.E. Factors which influence the growth of heat-treated bacteria. **Department of Bacteriology**, 1942. Disponível em: [www.jb.asm.org](http://www.jb.asm.org). Acesso em 18 de junho de 2007.

NICKERSON,A.; BHUTA,P; ORTON,G.; ALVIN,B. Monitoring dental sterilizer's effectiveness using biological indicators. **Dental Hygiene**, V.64, n.2, p.69-73, 1990.

OCIO, M. J.; FERNANDEZ, P.; RODRIGO, F.; MARTINEZ, A. Heat Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores in Alginate-mushroom Puree Mixture. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.391-395, 1996.

OLSON, J. R.; NOTTINGHAM, P. M. Factores que Afectam a la Supervivencia de los Microorganismos em los Alimentos **Ecologia Microbiana de los Alimentos**, v. 1, p. 1727, 1980.

OLSON, K. E.; SORRELLS, K. M. 1992. Thermophilic Flat Sour Sporeformers. IN: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. **American Public Health Association**, 3 ed. Washington DC, p. 299-306, 1991.

OKELO, P.O. Relating spore population of acid producing thermophilic organisms and artificially inoculated *Bacillus stearothermophilus* to processing variables during extrusion of a standardized feed formulation . Dissertation submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Maryland, College Park in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, 2003.

ORTIZ, L.M. Modificaciones del Método Oficial de la AOAC para Preparação de la Suspensión de Esporas de *Bacillus stearothermophilus*. **Revista Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, Venezuela, v. 22, n. 3, p.23-26, 1991.

PAIDHUNGAT, M.; SETLOW, P. Role of Ger Proteins in Nutrient and Nonnutrient Triggering of Spore Germination in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.9, p.2513-2519, 2000.

PAIDHUNGAT, M.; SETLOW, B.; DRIKS, A.; SETLOW, P. Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* which Lack Dipicolinic Acid. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 5505-5512, 2000.

PAIDHUNGAT, M.; RAGKOUSI, K.; SETLOW, P. Genetic Requirements for Induction of Germination of Spores of *Bacillus subtilis* by Ca(2+)-dipicolinate. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 4886-4893, 2001.

PALOP, A.; SALA, F.J.; CONDÓN, S. Heat Resistance of Native and Demineralised Spores of *Bacillus subtilis* Sporulated at Different Temperatures. **Applied and Envirommental Microbiology**, p.1316-1319, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. E MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PAOLETTI, L. C.; JOHNSON, K. D., Purification of preparative quantities of group B *Streptococcus* type III oligosaccharides. **Journal Chromatography**, v. 705, p. 363-368, 1995.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 14.00.04- Procedimento para a Produção do Esteriteste**. Rev 02, 10p, Piraquara, 19/05/2003.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 14.00.02- Procedimento para a Produção e Padronização do Concentrado de Esporos do *Geobacillus stearothermophilus***. Rev 05, 16p, Piraquara, 16/05/2005.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde- SESA /Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos. **POP 3.10.03 - Procedimento para Dosagem de proteínas – Método Lowry modificado**. Rev 02, 10p, Piraquara, 19/05/2003.

PAUSTIAN, T. Inclusions and other internal structures. University of Wisconsin-Madison. Disponível em : <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/Inclusions.html>. Acesso em: 05/08/08.

PENNA,T.C.V.; MACHOSVILI, I. A; BASTON, L. M. Importância da autoclave em lactário hospitalar. **Laes & Haes**, São Paulo, v.16, n. 91, p. 68-74, 1994.

PENNA, T.C.V.; MACHOSVILI, I.A. Esterilização Térmica: Conceitos Básicos da Cinética de Morte Microbiana. **Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo**, Sup.1, p.1-5, 1997.

PENNA, T.C.V.; MACHOSVILI, I.A.;TAQUEDA, M.E.S.; ISHII,M. The Effect of Media Composition on the Thermal Resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **PDA Journal of Pharmaceutical Science e Technology**, v. 54, n. 5, p. 398-412, 2000.

PENNA, T.C.V. et al .The Effect of Bioindicator Preparation and Storage on Thermal Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.525-538, 2002.

PFLUG,I.J.; SMITH,G.M.; CHRISTENSEN,R. Effect of Soybean Casein Digest Agar lot on Number of *Bacillus stearothermophilus* Spores Recovered. **Applied and Environmental Microbiology**, p.226-230, 1981.

PINTO, T.J.A.; SAITO, T. Esterilização por Óxido de Etileno.I.Influência do Meio de Esporulação na Resistência dos Esporos de *Bacillus subtilis* var.niger. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.26, n.6, 1992.

PORTER, J. E. *et al.* Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean  $\alpha$ -galactosidase. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v.14, p.609-613, 1992.

PORTER, J. E.; LADISCH, M. R. Ion-exchange and affinity chromatography costs in  $\alpha$ -galactosidase purification. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.39, p.717-724, 1992.

POTTS, M. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. **Microbiology**. Rev 58, p. 755-805, 1994.

PRISTA, N. L.; ALVES, C. A.; MORGADO, R. M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**, 2 ed, Liboa: Fund. Caloust, v.3. p. 428-429, 1979.

RASO, J.; BARBOSA-CINOVAS, G.; SWANSON, B.G. 1998. Sporulation Temperature Affects Initiation of Germination and Inactivation by High Hydrostatic Pressure of *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.17-24, 1998.

REAL, G.; HENRIQUES, A. O. Controlo da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, n. 68, p. 2-12, 2001.

RUIZ, A.; ACOSTA, M.; CISNEROS, F. Utilizacion de enzimas en los procesos de obtencion de leche y derivados de la soya. **Alimentaria**, Madrid, v.33, p.127-132, 1995.

RUSSELL, A. D. Lethal Effects of Heat on Bacterial Physiology and Structure. **Science**, Progr 86, p.115-137, 2003.

SASAKI, K. *et al.* Effect of Calcium in Assay Medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. **Applied and Environmental Microbiology**, p.5509-5513, 2000.

SCHMIDT, C.V. The Resistance of Bacterial Spores with Reference to Spore Germination and its Inhibition. **In Resistance of Bacterial Spores**, p.387-397, 1955.

SELLA, S. R. B. R. Produção e Controle de Qualidade de Indicadores Biológicos para Esterilização a Vapor. **Revista da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**, v.27, n.1, p. 31-36, 1995.

SETLOW, P. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. **Soc Applied Bacteriology Symposium**, Ser 23:49S-60S, 1994.

SETLOW, P. Resistance of bacterial spores. **In Bacterial stress responses**, Washington, D.C., p. 217-230, 2000.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **TRENDS in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 172-180, 2007.

SETLOW, P. The bacterial spore: nature's survival package. **Oxoid**. V. 26, n.2, September. 2005.



SILVA H.C., BRAGA G.L., BIANCHI M.L.P., LOPES D.C.O. Oligossacarídeos da família da rafinose e flatulência. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v.4, p.48-60, 1992.

SIQUEIRA, P. F. *et al.* Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, 2008. Disponível em journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech).

SHINTANI, H. *et al.* Validation of D value by different SCD culture medium manufacturer and/or different SDC culture medium constituent. **PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v.54, n.1, p.6-12, 2000.

SMITH, G.M. *et al.* Effect of Environmental Conditions During Heating on Commercial Spore Trip Performance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.1, p.12-18, 1982.

SPICHER, G.; PETERS, J.; BORCHERS, U. Microbiological efficacy of superheated steam. I. Communication: Results with spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus* and with spore earth. **Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin**, v. 201, p. 541-553, 1999.

Soccol, C.R.; e Vandenberghe, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003..

SOUZA JR, W.C. **Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactoligossacarídeos**. Dissertação (magister scientiae). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. 67p.

STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J., **The oligosaccharides**. 1st Edition. Academic Press, New York, 567 p., 1965.

STUMBO, C.R. *Thermobacteriology in Food Processing*. 2 ed. Academic Press, 1973.

TOLEDO, R. T. *Fundamentals of Food Process Engineering*. 2 ed. Edition Chapman & Hall, 1991.

U.S.P. 22. Biological Indicators-Resistance and Performance Tests. In: **The United States Pharmacopeia**. 22 ed., Rockville United States, 1990, p. 1706-1710, 1625-1626.

U.S.P. 24. Chapter 55. Biological Indicators -Resistance and Performance Tests. In: **The United States Pharmacopeia**. 24 rd rev., Rockville: United States Pharmacopeial Convencion, 2000a.

U.S.P. 24. Chapter 1035. Biological indicators. In: **The United States Pharmacopeia**. 24 rev., Rockville: United States Pharmacopeial Convencion, 2000b.

U.S. P. 24. Biological indicator for dry-heat sterilization, paper strip. *In: The United States Pharmacopeia*. 24 rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, 2000c.

U.S.P. 29. Chapter 55. Biological Indicators-Resistance and Performance Tests. *In : The United States Pharmacopeia*. 29 ed rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, 2006, p. 2501 -2503.

U.S.P. 29. Chapter 1211. Sterilization and sterility assurance of compendial articles Tests . *In : The United States Pharmacopeia*. 29 ed rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, 2006. Disponível em: [www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_c1211.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1211.html).

U.S.P. 29. Chapter 1035, Biological indicators for sterilization.Tests . *In: The United States Pharmacopeia*. 29 ed rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, 2006. Disponível em: [www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_c1035.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1035.html).

U.S.P. 24. Biological indicator for steam sterilization, paper strip. *In: The United States Pharmacopeia*. 24 ed. rev., Rockville United States Pharmacopeial Convencion, 1995, p.1847-1849, 1976-1981.

Validacion de ciclos de esterilizacion con vapor. **Parenteral Drug Association, INC**, Monografia técnica n. 1, ver. I, Santich, 1983

ZECHMAN,L.G.; PFLUG,I.J. *Bacillus stearothermophilus* Spore Recovery Altered by Media Concentration and Formulation. **Journal of Food Science**, v.56, n.5, p.1408-1411,1991.

WORDEN, R.M.; SUBRAMANIAN, M. J.; WINTER, B. S.; ARONSON,C.L. Growth kinetics of *Bacillus stearothermophilus* BR 219. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28/29, p.267-275, 1991.

YOKOYA,F.; YORK,G. K. Effect of Several Environmental Conditions on the "Thermal Death Rate" of Endospores of Aerobic,Thermophilic Bacteria. **Applied of Microbiology**, v.13, n. 6, 1965.

## ANEXO 1 – MEMÓRIA DE CÁLCULO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DO INDICADOR BIOLÓGICO ESTERITESTE E IB COM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

Para a produção de um lote de concentrado de esporos são necessários 1600 mL do meio ágar para esporulação modificado, fracionado em garrafas de Roux num volume de 400 mL/garrafa.

### FORMULAÇÃO DO ÁGAR PARA ESPORULAÇÃO MODIFICADO

| Componente           | Quantidade<br>g/1000 mL de meio | Preço/quilo<br>(R\$) | Preço total |
|----------------------|---------------------------------|----------------------|-------------|
| Peptona de caseína   | 3,0                             | 717,00               | 0,002       |
| Triptona             | 5,0                             | 698,00               | 3,49        |
| Extrato de carne     | 3,0                             | 370,70               | 1,11        |
| Extrato de leveduras | 5,0                             | 294,00               | 1,82        |
| Sulfato de manganês  | 0,05                            | 704,00               | 0,035       |
| Sulfato de magnésio  | 0,05                            | 228,40               | 0,011       |
| Cloreto de cálcio    | 0,05                            | 545,00               | 0,027       |
| Fosfato de potássio  | 0,05                            | 30,00                | 0,001       |
| Ágar                 | 20,0                            | 549,00               | 10,98       |
| Água purificada      | 1000 mL                         | 0,40                 | 0,40        |
| Custo Total / litro  |                                 |                      | 17,88       |

FONTE : O AUTOR (2008)

O custo do meio de cultura para quatro garrafas de Roux é de R\$ 28,60.

Os controles de qualidade realizados na padronização da suspensão aquosa de esporos e seus respectivos custos encontram-se na tabela abaixo.

### CUSTOS DOS CONTROLES DE QUALIDADE PARA A PRODUÇÃO DE SUSPENSÃO AQUOSA DE ESPOROS

| TESTE                     | VALOR UNITÁRIO<br>(R\$) | QUANTIDADE/LOTE | TOTAL (R\$) |
|---------------------------|-------------------------|-----------------|-------------|
| Contagem de colônias      | 60,00                   | 4               | 240,00      |
| Viabilidade               | 30,00                   | 3               | 90,00       |
| Termorresistência         | 150,00                  | 3               | 450,00      |
| Pesquisa de contaminantes | 60,00                   | 1               | 60,00       |
| Controle ambiental        | 60,00                   | 1               | 60,00       |
| Custo total / lote        |                         |                 | 900,00      |

FONTE: O AUTOR (2008)

Cada lote de suspensão de esporos possui 200 mL. Para a produção de um lote de IB com 12.000 mL, são necessários em média 18 mL de suspensão aquosa de esporos. Portanto, um lote de suspensão de esporos produz em média 11 lotes de IB. Sendo assim, o custo da suspensão aquosa de esporos / lote de IB é de R\$ 84,42.

## CONTROLES DE QUALIDADE PARA A PRODUÇÃO DE IB AUTOCONTIDOS

| <b>TESTE</b>              | <b>VALOR<br/>UNITÁRIO (R\$)</b> | <b>QUANTIDADE/LOTE</b> | <b>TOTAL (R\$)</b> |
|---------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------|
| Contagem de colônias      | 60,00                           | 1                      | 60,00              |
| Viabilidade               | 30,00                           | 1                      | 30,00              |
| Termorresistência         | 150,00                          | 1                      | 150,00             |
| Pesquisa de contaminantes | 60,00                           | 2                      | 120,00             |
| Controle ambiental        | 60,00                           | 2                      | 120,00             |
| <b>TOTAL / lote</b>       |                                 |                        | <b>480,00</b>      |

FONTE: O Autor (2008)

Considerando-se que os controles de qualidade para os dois meios são os mesmos, os custos de um lote de produção com 4000 frascos-ampola do meio E-CPPI é de R\$ 646,85 e com o meio VS+EL (1:70) é de R\$ 612,18.